



UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

## Autofàgia i funció termogènica en el teixit adipós marró

Montserrat Cairó Calzada



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Grup de Genètica i Biologia Molecular de  
Proteïnes Mitocondrials i Patologies Associades  
Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular  
Facultat de Biologia

Programa de Doctorat en Biomedicina

# **Autofàgia i funció termogènica en el teixit adipós marró**

Memòria presentada per

**Montserrat Cairó Calzada**

per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Montserrat Cairó Calzada

Firma dels directors

Dr. Francesc Villarroya i Gombau

Dr. Joan Villarroya Terrade

Barcelona, 2017





# AGRAÏMENTS

La present tesi doctoral s'organitza segons la normativa vigent per que fa al format He de confessar que fins que no m'he posat davant del full en blanc em feia una mica de por no saber expressar fins a quin punt estic agraïda a la gent que m'ha acompanyat en el transcurs d'aquesta tesi. Però, que carai! Si he pogut escriure aquest totxo crec que podré amb això!

Els meus agraïments principals són per en Cesc i la Marta. Moltes gràcies als dos per haver-me donat l'oportunitat de formar part de la família TAM. Bé, moltes gràcies no només per haver confiat en mi (passar una entrevista de feina en el TAM es dificiliiiisim) sinó per haver-me fet créixer com investigadora i també com a persona. I es que la tesis t'ensenya moltes coses...i no totes tenen a veure amb la ciència. De debò, a part de ser uns grans científics (cosa que ja sabeu, no cal que ara vingui jo a dir-vos-ho), sou unes grans persones.

També m'agradaria agrair a la Roser, la Teresa i a l'Octavi haver-me ajudat sempre que ho he necessitat i haver format part de les discussions científiques que m'han dut fins on soc ara.

I es clar: gràcies Joan! Moltes gràcies de debò per mil coses: haver-me acollit i ensenyat quan vaig aterrar al lab (tot i que t'agrades dir-me gat vell), per haver sigut part de la direcció d'aquesta tesi, per haver-me acompanyat quan les coses no surten i especialment per haver-me empitjorat la salut hepàtica a base de cerveses i patates berberetxo!

Gràcies a tots els membres d'Ambiente obesogenico! Quina gent! Esteu tots fatal, però sense vosaltres tot seria una mica mes avorrit: des d'anar a buscar un cafè després de dinar (per els que encara se'n recorden de lo difícil que era fa uns anys), fins anar d'excursió i acabar pujant muntanyes. Així que gràcies per haver fet d'anar a treballar una festa; de fet el TAM3 és pràcticament una discoteca amb Dj. Ibon (ai, como te hecho de menos), Sing-star Samantha, Hula-Cèlia i el Fino-filipino/Spider-Albert. A la Gemma per ser tan positiva. Mencion epecial a la gente de tardes, a los que no nos gusta madrugar: Tania, no se si sabes que eres una persona maravillosa, viva esos margaritas de tamarindo!; Ricardo muchas gracias por muchas cosas, por acompañarme en esas tardes, por cuidar de mi gato, y por las quesadas, y el toyo!; Rubèn, uf, quin tio! Cientific/informatic-director-de-cine/deambulador-profesional, gràcies per ajudar-me sempre. Mercheeee! Gràcies per "L'Hola bonica!" que m'alegra el dia. I al Josemi i l'Aleix, els zipi i zape del lab (al loro! que no los embauquen, que hay gente que va de seria ...y no lo es!). A la Laura, per les xerrades a "les pizzas" (que en realitat son cerveses), allà si que ens hi hem deixat mitja beca! And Marion, you always know what I'm thinking....so, you know. I al niño-Àlex i la niña-Inés, molta sort i vigileu ...es pot acabar com jo! També no vull oblidar-me de les dues noies que m'ajudaven a la lluita femenina als inicis, a l'Anna (que ara viu feliç al seu despatx) i a la Isis (que ara espero que visqui feliç pel món!). I al Francesc Ribas!

I què hauria estat de mi sense les Biogirls! Amb vosaltres va començar tot! Gràcies a totes per ser acompanyar-me tots aquests anys. Blanca i Fani (les mamis), Rebe (la basca), Marta i Nuri (les hippies-happies), Ali (que feliç que vius!), Barbara (la que semblava xunga i es un tros de pa). I els bioboys! I Biobabies!. I me'n falta una, però per aquesta hi ha apartat a part. Gràcies Bea, i es que literalment no se que

faria sense tu! Us estimo molt! A tu i al teu senyor! Per a qui també hi ha menció especial, es clar! Lluís, uf, a tu no cal que t'expliqui per què et dono les gràcies..you know. Sou molt grans els dos (perdó, tres), i cuquis!

I a l'Anna i l'Albert! Encara no se com he sortit tan normal amb aquest parell de germans! Gràcies Anna per la teva alegria i per ser un trasto! I gràcies Albert perquè sense tu no hagués arribat mai fins aquí.

Aquesta tesi però, va dedicada especialment als meus pares i a l'Arnau. Per tot. Perquè us estimo.

# PRESENTACIÓ

La present tesi doctoral s'organitza segons la normativa vigent per que fa al format de tesi com a compendi de publicacions establerta per la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

1. Índex
2. Abreviatures
3. Introducció general
4. Objectius
5. Informe del director de tesi sobre els articles publicats
6. Publicacions:
  - Thermogenic activation represses autophagy in brown adipose tissue
  - Parkin, a novel actor in the control of brown adipose tissue activity
  - Hormonal and nutritional signalling in the control of brown and beige adipose tissue activation and recruitment
  - Lipopolysaccharide-binding protein is a negative regulator of adipose tissue browning in mice and humans
7. Resum de resultats i discussió global
8. Conclusions
9. Bibliografia
10. Apèndix:
  - The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes



# ÍNDEX

---

PRESENTACIÓ .....	5
ÍNDEX .....	7
ABREVIATURES .....	9
INTRODUCCIÓ GENERAL .....	11
1. El teixit adipós	
1.1. Classificació dels diferents teixits adiposos.....	13
1.2. Distribució dels teixits adiposos.....	15
1.3. Diferenciació adipocitària.....	17
1.3.1. La diferenciació dels adipòcits blancs.....	17
1.3.2. La diferenciació dels adipòcits marrons.....	18
1.3.3. La diferenciació dels adipòcits beix.....	19
1.4. Funció del teixit adipós.....	20
1.4.1. Funció del teixit adipós blanc.....	20
1.4.1.1. Lipogènesi i emmagatzematge de lípids.....	20
1.4.1.2. Lipòlisi i mobilització de reserves.....	21
1.4.1.3. Funció secretora del teixit adipós blanc.....	22
1.4.2. Funció del teixit adipós marró.....	23
1.4.2.1. UCP1 i el mecanisme de producció de calor.....	23
1.4.2.2. La termogènesi adaptativa.....	24
1.5. Regulació de la termogènesi adaptativa en el TAM.....	24
1.5.1. Regulació noradrenèrgica.....	24
1.5.2. Regulació endocrina i nutricional.....	25
1.5.2.1. Regulació per hormones tiroïdals.....	25
1.5.2.2. Regulació per FGF21.....	25
1.5.2.3. Regulació per àcids biliars i l'eix fetge-intestí.....	26
1.5.2.4. Regulació per senyals musculars i cardíques.....	26
1.5.2.5. Regulació per factors de la dieta.....	26
1.5.3. Regulació de la termogènesi adaptativa a través de la funció secretora del TAM.....	27
2. L'autofàgia	
2.1. Tipus d'autofàgia.....	30
2.1.1. La microautofàgia.....	30
2.1.2. La macroautofàgia.....	31
2.1.3. L'autofàgia facilitada per xaperones.....	31
2.2. La maquinària autofàgica.....	32
2.2.1. Els complexos de nucleació.....	32
2.2.1.1. El complex ULK.....	32
2.2.1.2. El complex PI3KC3.....	33
2.2.2. La formació del fagòfor.....	33
2.2.3. Les cascades de conjugació.....	33
2.2.3.1. La cascada de conjugació Atg12-Atg5.....	33
2.2.3.2. La cascada de conjugació LC3.....	34
2.2.4. Maduració i fusió de l'autofagosoma.....	34
2.2.5. Anàlisi experimental de l'activitat autofàgica.....	34
2.3. Inducció de l'autofàgia .....	35
2.3.1. Regulació dependent de mTORC1.....	36
2.3.1.1. Factors de creixement i insulina.....	37
2.3.1.2. Aminoàcids.....	37
2.3.1.3. Estatus energètic cel·lular.....	37
2.3.2. Regulació independent de mTORC1.....	37

2.3.2.1.	Calci.....	37
2.3.2.2.	Estrès de reticle.....	38
2.3.2.3.	Regulació a través de Beclin1.....	38
2.3.3.	Control transcripcional de l'autofàgia.....	38
2.4.	Autofàgia en el metabolisme energètic.....	39
2.4.1.	Autofàgia en el catabolisme de proteïnes.....	40
2.4.2.	Autofàgia en la homeòstasi de la glucosa.....	40
2.4.3.	Autofàgia en el catabolisme de lípids.....	41
2.5.	Implicació de l'autofàgia en malalties humanes.....	41
2.5.1.	Malalties neurodegeneratives.....	41
2.5.2.	Malalties cardiovasculars i miopaties.....	42
2.5.3.	Càncer.....	43
2.6.	Implicació de l'autofàgia en l'obesitat.....	43
2.6.1.	El fetge.....	43
2.6.2.	L'hipotàlem.....	44
2.6.3.	El teixit adipós.....	44
2.6.3.1.	Autofàgia en el TAB.....	45
2.6.3.2.	Autofàgia en el TAM.....	46
3.	Mitofàgia i Parkin	
3.1.	Receptors autofàgics.....	47
3.2.	Mitofàgia.....	47
3.2.1.	Dinàmica mitocondrial i mitofàgia.....	47
3.2.2.	PINK1 i Parkin.....	48
3.3.	Funcions de Parkin en el metabolisme cel·lular.....	50
3.3.1.	Parkin en el metabolisme de la glucosa.....	50
3.3.2.	Parkin en el metabolisme dels lípids .....	51
	OBJECTIUS.....	53
	INFORME DELS DIRECTORS DE TESI.....	57
	PUBLICACIONS.....	61
	- Thermogenic activation represses autophagy in brown adipose tissue.....	63
	- Parkin, a novel actor in the control of brown adipose tissue activity .....	75
	- Hormonal and nutritional signalling in the control of brown and beige adipose tissue activation and recruitment .....	117
	- Lipopolysaccharide-binding protein is a negative regulator of adipose tissue browning in mice and humans .....	131
	RESUM DE RESULTATS I DISCUSSIÓ GLOBAL .....	145
	CONCLUSIONS .....	155
	BIBLIOGRAFIA .....	159
	APÈNDIX .....	177
	-The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes .....	179

## ABREVIATURES

---

A continuació es mostra una relació, per ordre alfabètic, de les principals abreviatures i sigles emprades en la memòria de la present tesi doctoral. Aquestes i altres abreviatures menys freqüents es troben detallades en el text.

<b>AgRP</b>	Proteïna-r agouti
<b>AMBRA1</b>	Molècula activada en l'autofàgia regulada per Beclin1
<b>AMPK</b>	Proteïna cinasa activada per AMP
<b>aP2(FABP4)</b>	Proteïna adipocitària
<b>Atg</b>	Proteïna relacionada amb l'autofàgia
<b>ATGL</b>	Lipasa de triglicèrids adipocitària
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfat
<b>BNIP3</b>	Proteïna d'interacció amb la proteïna BCL2/adenovirus E1B de 19kDa 3
<b>cAMP</b>	AMP cíclic
<b>CD36</b>	Cúmul de diferenciació 36
<b>C/EBP</b>	Proteïna d'unió a seqüència CCAAT i a potenciadors
<b>CMA</b>	Autofàgia facilitada per xaperones
<b>CREB</b>	Element d'unió en resposta a AMP cíclic
<b>DNA</b>	Àcid dexsoxiribonucèic
<b>DRP1</b>	Proteïna relacionada amb la dinamina
<b>FABP4(ap2)</b>	Proteïna d'unió a àcids grassos 4
<b>FAS</b>	Àcid gras sintasa
<b>FATP</b>	Proteïna transportadora d'àcids grassos
<b>FoxO</b>	Proteïna de caixa de cap de força O ( <i>Forkhead box O</i> )
<b>FXR</b>	Receptor X farnesoide
<b>GABARAP</b>	Proteïna associada al receptor gamma aminobutíric
<b>GLUT4</b>	Transportador de glucosa 4
<b>HDAC6</b>	Histona desacetilasa 6
<b>HFD</b>	Dieta rica en greixos
<b>Hsc70</b>	Proteïna de xoc tèrmic de 70kDa
<b>HSL</b>	Lipasa sensible a hormones
<b>IGF-1</b>	Factor de creixement insulínic tipus 1
<b>LAMP-2A</b>	Proteïna de membrana associada a lisosomes 2A
<b>LC3</b>	Cadena lleugera 3 de la proteïna associada a microtúbuls 1
<b>LD</b>	Gota lipídica
<b>LDL</b>	Lipoproteïna lipasa
<b>MAPK</b>	Cinasa activada per mitògens
<b>MGL</b>	Lipasa de monoglicèrids
<b>MTF</b>	Mitofusina
<b>mtDNA</b>	ADN mitocondrial
<b>mTORC1</b>	Proteïna diana de la rapamicina de mamífers complex 1
<b>NE</b>	Noradrenalina o norepinefrina
<b>NEFA</b>	Àcids grassos no esterificats
<b>OPA1</b>	Proteïna de la atrofia òptica 1
<b>OPT</b>	Optineurina
<b>PARL</b>	Proteïna associada a presinilina semblant a romboide
<b>PDH</b>	Piruvat deshidrogenasa
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PGC-1α</b>	Coactivador de PPARγ 1
<b>PI3KC3</b>	Fosfatidilinositol-3-cinasa Classe III
<b>PI<sub>3</sub>P</b>	Fosfatidilinositol-3-fosfat
<b>PINK1</b>	Cinasa putativa induïda per PTEN
<b>PKA</b>	Proteïna cinasa A
<b>PLIN</b>	Perilipina
<b>PPAR</b>	Receptor activat per proliferació lisosomal



<b>POMC</b>	Proopiomelanocortina
<b>RE</b>	Reticle endoplasmàtic
<b>Rheb</b>	Proteïna homòloga a Ras enriquida en cervell
<b>RXR</b>	Receptor de retionoides X
<b>SQSTM1</b>	Sequestrosoma 1
<b>SVF</b>	Fracció de l'estroma vascular
<b>TAB</b>	Teixit adipós blanc
<b>TAM</b>	Teixit adipós marró
<b>TAMO</b>	Teixit adipós del moll de l'os
<b>TFEB</b>	Factor de transcripció EF
<b>TG</b>	Triglicèrid
<b>UBL</b>	Proteïna similar a la ubiquitina
<b>UCP</b>	Proteïna desacobladora
<b>ULK</b>	Cinasa activadora de l'autofàgia similar a unc-51
<b>VLDL</b>	Lipoproteïna de molt baixa densitat

# INTRODUCCIÓ GENERAL

---



# INTRODUCCIÓ GENERAL

## 1. EL TEIXIT ADIPÓS

---

El teixit adipós tradicionalment ha estat considerat un lloc d'emmagatzematge d'energia per tal de sustentar les necessitats metabòliques de l'organisme en períodes d'escassetat d'aliments. Els avenços duts a terme durant les últimes dècades han possibilitat que a dia d'avui sigui considerat un òrgan complex capaç de dur a terme funcions de gran importància per a la homeòstasi energètica de l'organisme. L'òrgan adipós ha emergit com a un nou òrgan secretor de factors autocrins, paracrins i endocrins, importants en diversos aspectes fisiològics que van des del control de la temperatura corporal, a la reproducció o a la regulació de la densitat òssia<sup>1</sup>.

Els teixits adiposos estan formats principalment per els adipòcits, que són les cèl·lules especialitzades en l'emmagatzematge de l'excés d'energia en gotes lipídiques (LD). A diferència d'altres tipus cel·lulars, els adipòcits estan preparats per contenir grans quantitats de lípids intracel·lulars sense patir-ne els efectes lipotòxics. Tot i que de manera fisiològica es poden trobar petites LD en altres tipus cel·lulars, com en els hepatòcits i en els cardiomiòcits durant per exemple les primeres hores del dejuni, a diferència dels adipòcits, la presència d'aquestes LD de manera permanent es considera patològica. Juntament amb els adipòcits hi ha d'altres tipus cel·lulars que formen part dels teixits adiposos: cèl·lules precursors multipotencials, preadipòcits, fibroblasts, cèl·lules endotelials, terminals nervioses neuronals i cèl·lules del sistema immunològic<sup>2</sup>; formant el que s'anomena fracció de l'estroma vascular (SVF).

### 1.1. CLASSIFICACIÓ DELS DIFERENTS TEIXITS ADIPOSOS

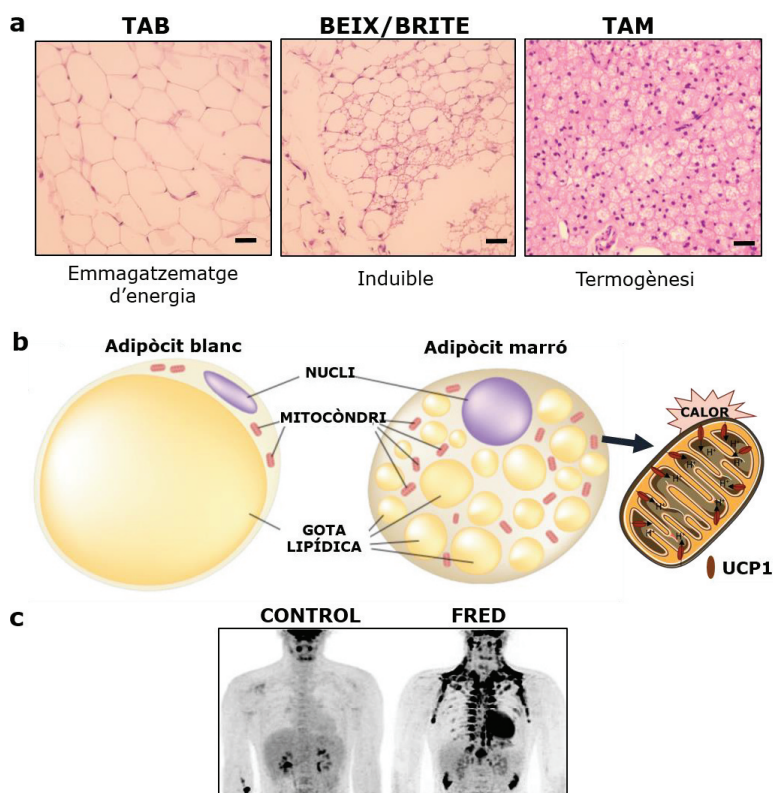
En humans i d'altres mamífers, l'òrgan adipós es pot dividir seguint criteris morfològics i funcionals en dos tipus principals de teixit: el teixit adipós blanc (TAB), i el teixit adipós marro (TAM)<sup>2</sup>. S'ha descrit un tercer tipus de teixit adipós, el teixit adipós del moll de l'os (TAMO), del qual parlarem breument ja que encara se'n desconeixen molts aspectes<sup>3</sup>.

El tipus cel·lular principal dels teixits adiposos és l'adipòcit (blanc, marro o beix) juntament amb cèl·lules precursors, immunitàries i endotelials<sup>4</sup>. El TAB està conformat principalment per adipòcits blancs, els quals es caracteritzen per emmagatzemar energia en forma de triglicèrids (TG) en una gran gota lipídica en el citosol. Quan l'organisme requereix de l'energia emmagatzemada (per exemple durant períodes de dejuni) s'activa la lipòlisi, per la qual aquests TG són hidrolitzats donant lloc àcids grassos (i glicerol) que s'alliberen a la circulació.

El TAM, d'altra banda, està format principalment per adipòcits marrons, la funció principal dels quals és el manteniment de la temperatura corporal de l'organisme a través del que es coneix com a termogènesi no associada a tremolor o termogènesi adaptativa, un mecanisme de producció d'escalfor. Així doncs, tot i que els adipòcits marrons també emmagatzemen energia en forma de TG, a diferència dels adipòcits blancs ho fan per poder sustentar les seves pròpies necessitats energètiques.

Morfològicament poden diferenciar-se fàcilment ja que els adipòcits marrons tenen una gran quantitat de mitocondris i múltiples LD (són multiloculars) distribuïts per el citoplasma per tal de sustentar les necessitats oxidatives mitocondrials (Figura 1a i b). El TAM és un teixit metabòlicament molt actiu, amb mitocondris amb una gran capacitat oxidativa, i capaç de dur a terme una gran despesa energètica. Això és gràcies a l'expressió de la proteïna desacobladora 1 (UCP1), una proteïna de la membrana mitocondrial interna capaç de desacoblar la cadena respiratòria de la fosforilació oxidativa, dissipant el gradient de protons de manera que es genera calor enlloc d'ATP.

Recentment s'ha identificat un segon tipus d'adipòcit marró, present tant en humans com en rosegadors, amb capacitat termogènica: l'adipòcit beix o brite<sup>5,6</sup>. Els adipòcits beix apareixen agrupats en zones de TAB quan els estímuls termogènics es perllonguen en el temps (especialment en els dipòsits subcutanis) i es caracteritzen per tenir una morfologia similar a la dels adipòcits marrons clàssics i per induir l'expressió d'UCP1. Aquest fenomen es coneix com a *browning*. Per tal d'activar la termogènesi els adipòcits beix necessiten ser estimulats, per això també se'ls anomena adipòcits induïbles (Figura 1c)<sup>7</sup>. S'han dedicat molts esforços per tal de caracteritzar els adipòcits beix i poder-los diferenciar dels adipòcits marrons clàssics. En primer lloc s'han establert una sèrie de marcadors típicament beix en ratolins: *Tbx1*, *Tmem26*, *Tnfrsf9*, *Shox2*, *Cited1*; i d'altres típicament marró clàssic: *Zic1*, *Lhx8*, *Eva1*, *Ebf3*, *Fbxo31*<sup>6,8</sup>. D'altra banda, com veurem més endavant, s'ha pogut determinar que aquests adipòcits beix procedeixen d'un llinatge cel·lular diferent al dels adipòcits marrons clàssics.



Els adipòcits del TAMO són fenotípicament similars als adipòcits blancs presentant una gran LD citosòlica. A diferència del TAB però, la funció del TAMO sembla estar relacionada amb les necessitats energètiques locals del propi os. És possible que el

TAMO tingui un rol paracrí en el moll de l'os ja que pot secretar d'adipocines com la leptina, l'adiponectina o diverses citocines inflammatòries<sup>9</sup>. A dia d'avui es coneix que els nivells de TAMO correlacionen positivament amb l'edat i amb una baixa qualitat òssia, per exemple, en el cas de pacients amb osteoporosi o amb anorèxia nerviosa; en canvi la relació dels nivells de TAMO i el metabolisme energètic sistèmic no és tan clara: tant la obesitat com la restricció calòrica semblen afavorir la formació de TAMO. Les cèl·lules òssies (osteoclasts i osteoblasts) i les del TAMO provenen dels mateixos precursors, d'aquesta manera quan s'afavoreix l'adipogènesi en el moll de l'os sovint és en detriment de la diferenciació de les cèl·lules òssies.

## 1.2. DISTIBUCIÓ DELS TEIXITS ADIPOSOS

L'òrgan adipós està distribuït al llarg del cos en diversos dipòsits. La distribució anatòmica dels dipòsits adiposos es troba relacionada amb les funcions que duen a terme i amb la fisiopatologia de l'òrgan<sup>10,11</sup>. D'aquesta manera, en ratolins els dipòsits adiposos a més a més de classificar-se segons si són de TAM o de TAB, poden ser distingits per si són subcutanis o viscerals i segons la posició anatòmica concreta (Taula 1).

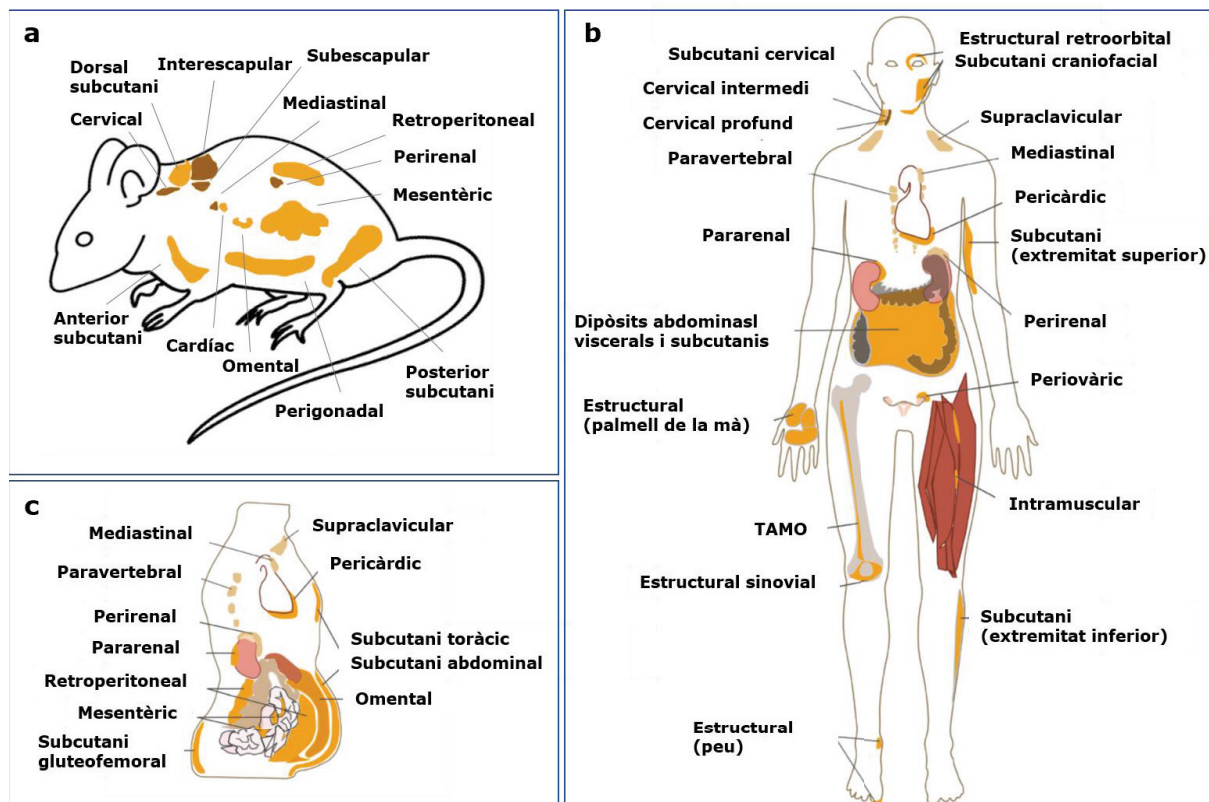
<b>TEIXIT ADIPÓS MARRÓ (TAM)</b>	
<b>INTERESCAPULAR</b>	Situat sobre les escàpules en forma de dos lòbuls simètrics. És el dipòsit de TAM més gran.
<b>CERVICAL</b>	Situat sota el feix muscular cervical a la part interna del coll.
<b>SUBESCAPULAR</b>	Situat sota les escàpules entre la musculatura de l'esquena, també se'l coneix com a axil·lar.
<b>MEDIASTINAL</b>	Situat a la part interna del tòrax a la zona del mediastí, també se'l coneix com a periaòrtic.
<b>PERIRENAL</b>	Situat envoltant gran part de l'hil renal en contacte amb l'artèria i la vena renals i l'urèter.
<b>TEIXIT ADIPÓS BLANC (TAB)</b>	
<b>DIPÒSITS DE TAB SUBCUTANIS</b>	
<b>POSTERIOR SUBCUTANI</b>	Situat sota la dermis des de la pelvis dorsal fins la zona inguinal. Aquest dipòsit es subdivideix en: dorsolumbar, inguinal i glútia.
<b>DORSAL SUBCUTANI</b>	Situat sobre el TAM interescapular amb el que es troba intrínsecament unit.
<b>ANTERIOR SUBCUTANI</b>	Situat a la part dorsal-proximal de les extremitats davanteres entre la pell i les fàscies musculars.
<b>DIPÒSITS DE TAB VISCERALS</b>	
<b>PERIGINADAL</b>	Situat envoltant les gònades, s'anomena epididimal en mascles i periovàric en femelles.
<b>RETROPERITONEAL</b>	Situat a la part dorsal, es troba encapsulat per una fina membrana que el separa del ronyó i del TAM perirenal.
<b>CARDÍAC</b>	Situat envoltant el cor des del ventricle detret fins l'àpex, sol tenir poc gruix.
<b>MESENTÈRIC</b>	Situat en el mesenteri envoltant la superfície intestinal.
<b>OMENTAL</b>	Situat sobre la superfície de l'estómac en la cavitat abdominal.

**Taula 1. Classificació dels dipòsits de teixit adipós en ratolins segons la funció i la distribució anatòmica.**

A més a més dels dipòsits principals, es poden trobar petits dipòsits adiposos dispersos en l'organisme vinculats a determinats òrgans com per exemple vetes de teixit adipós entre les fibres musculars o el ja mencionat TAMO.

Com que la distribució del teixit presenta certes variacions entre humans i ratolins, en aquesta introducció comentarem breument les principals diferències (Figura 2). Cal mencionar que existeix cert dimorfisme sexual quant a la distribució i al comportament dels dipòsits adiposos, tant en humans com en ratolins<sup>12-14</sup>. En primer lloc el TAB subcutani en humans s'estén de manera continua sota la dermis havent-hi però zones on tendeix a acumular-se de manera preferencial, com la zona gluteofemoral o subcutània abdominal. En canvi el TAB visceral es pot subdividir en diversos dipòsits més ben definits: mesentèric, omental, pararenal, pericàrdic i retroperitoneal<sup>13</sup>.

En el cas del TAM en humans, aquest tradicionalment s'ha considerat un teixit restringit a les etapes neonatal i infantil, desapareixent poc a poc fins assolir l'edat adulta<sup>15</sup>. Recentment però l'ús clínic de la tomografia d'emissió de positrons per detectar zones d'alta captació de glucosa susceptibles de ser tumors (FDG-PET-CT-scan), ha revelat l'existència de TAM en humans adults (Figura 1c)<sup>16,17</sup>. El que en un primer moment es va considerar un artefacte de la tècnica, han resultat ser dipòsits de TAM i d'adipòcits beix metabòlicament actius<sup>18-21</sup>. A través de l'anàlisi de biòpsies humanes de TAM s'ha pogut detectar la presència dels diferents tipus d'adipòcit marró (clàssic i induïble) coexistint en els mateixos dipòsits durant l'etapa adulta<sup>22,23</sup>. La presència d'aquest teixit actiu correlaciona negativament amb l'índex de massa corporal (BMI) i amb l'edat dels pacients<sup>24,25</sup>.



**Figura 2. Principals dipòsits del teixit adipós en ratolins i en humans.** Esquema representatiu dels principals dipòsits adiposos en ratolins (a), i humans (b i c).



### 1.3. DIFERENCIACIÓ ADIPOCITÀRIA

El teixit adipós té el seu origen en el teixit embrionari mesodèrmic. Els adipòcits s'originen a partir de les cèl·lules mare mesenquimals (MSCs) durant el procés anomenat adipogènesi. En primer lloc les MSCs pateixen un procés de determinació de llinatge convertint-se en preadipòcits, els quals en la fase terminal de la diferenciació adquireixen la maquinària proteica necessària per la síntesi de lípids que possibilitarà la formació de les LD<sup>26</sup>.

El TAB i el TAM es desenvolupen en moments ontogènics diferents. En la majoria de mamífers el TAM es desenvolupa durant el període fetal i s'activa just després del naixement. En rosegadors per exemple, els adipòcits marrons maduren ràpidament durant els primers dies de vida<sup>27,28</sup>. En canvi el TAB en humans apareix a la meitat de la gestació mentre que en ratolins ho fa poc després del naixement.

Els adipòcits blancs i marrons deriven de diferents cèl·lules precursors. Generalment es considera que les cèl·lules precursors dels adipòcits marrons expressen el factor miogènic 5 (*Myf5*<sup>+</sup>) i la proteïna *paired-box 7* (*Pax7*<sup>+</sup>), compartint llinatge amb les cèl·lules musculars; mentre que els adipòcits blancs i els adipòcits beix provenen de precursors *Myf5*<sup>-</sup>. Recentment però, s'ha observat la presència d'adipòcits blancs provinents de precursors *Myf5*<sup>+</sup> i d'adipòcits marrons provinents de precursors *Myf5*<sup>-</sup> distribuïts en els diferents dipòsits adiposos<sup>29,30</sup>. Sembla ser que els adipòcits de la zona dorsal-anterior provenen preferencialment de precursors *Myf5*<sup>+</sup>, mentre que els de la zona ventral-posterior ho fan de precursors *Myf5*<sup>-</sup>, essent la posició anatòmica el factor més influent que determina el llinatge de procedència.

Els processos de diferenciació dels adipòcits s'han estudiat principalment a partir de models *in vitro*. Primerament té lloc una aturada de la proliferació determinada per una combinatòria de senyals proadipogèniques secretables, com les proteïnes de la família *wingless and int1* (WNT) i de la superfamília de factors de transformació tumors β (TGFβ); juntament amb estímuls físico-mecànics, com el contacte cèl·lula-cèl·lula o la composició i rigidesa de la matriu extracel·lular<sup>26,31</sup>. La combinatòria de factors WNT i TGFβ pot afavorir la diferenciació de les MSCs cap a adipòcits blancs, cap a adipòcits marrons o cap a la resta de llinatges relacionats (com cèl·lules òssies o musculars)<sup>32,33</sup>. Mentre que alguns membres de les proteïnes morfogenètiques òssies (BMPs) de la família TGFβ promouen l'adipogènesi dels adipòcits blancs, com BMP2 i BMP4<sup>34,35</sup>, d'altres promouen l'adipogènesi dels adipòcits marrons, com BMP7 i BMP9<sup>36,37</sup>.

Alguns membres de la família WNT que actuen a través de la via de la β-catenina, com WNT10b, o de la família TGFβ, com TGFβ, poden actuar com a inhibidors de l'adipogènesi. Un cop dut a terme el procés de determinació preadipocitària, tenen lloc una sèrie d'esdeveniments transcripcionals fins arribar a l'adipòcit madur. Aquests esdeveniments són diferents en adipòcits blancs i en adipòcits marrons.

#### 1.3.1. La diferenciació dels adipòcits blancs

Els principals factors de transcripció que intervenen durant la diferenciació terminal dels adipòcits blancs són: el receptor activat per proliferació peroxisomal γ (PPARγ) i els membres de la família de proteïnes d'unió a la seqüència CCAAT/potenciadors C/EBPα,β i δ.



Durant una primera fase, la presència dels factors adipogènics induïx l'expressió de C/EBP $\beta$ , en part a través de la via cAMP-PKA-CREB<sup>38</sup>, i de C/EBP $\delta$ <sup>39</sup>. Aquests dos membres de la família C/EBP induiran l'expressió d'altres factors de transcripció, com el receptor de glucocorticoids (GR), el receptor de retinoides X (RXR), i dels gens mestres de la resta del procés PPAR $\gamma$  i C/EBP $\alpha$ , iniciant una segona fase en la diferenciació terminal<sup>40</sup>.

La inducció de PPAR $\gamma$  i C/EBP $\alpha$  activa l'expressió de la majoria de proteïnes que caracteritzen el fenotip adipós com l'enzim de síntesi d'àcids grassos (FAS), el transportador de glucosa 4 (GLUT4), la proteïna d'unió a àcids grassos 4 (FABP4/ap2), l'enzim acetil-CoA carboxilasa (ACC), la lipasa sensible a hormones (HSL) i algunes adipocines com l'adiponectina<sup>41</sup>. PPAR $\gamma$  s'uneix al DNA en forma d'heterodímer juntament amb RXR i inicia la transcripció dels gens diana<sup>42</sup>. Existeixen correpressors transcripcionals que regulen l'activitat de PPAR $\gamma$  durant la diferenciació dels adipòcits com la proteïna d'interacció amb receptors 140 (RIP140), implicada en la inducció del fenotip "blanc" respecte el fenotip "beix" en els dipòsits de TAB<sup>43-45</sup>.

L'adipogènesi es pot afavorir farmacològicament a través de compostos que regulen els factors de transcripció mestres anteriorment mencionats. Aquests compostos sovint són usats en els còctels de diferenciació *in vitro*, com la 3-isobutil 1-metilxantina (IBMX), que manté elevades les concentracions de cAMP induint l'expressió de C/EBP $\beta$ ; la dexametasona, un glucocorticoide capaç d'induir l'expressió de les C/EBPs; o la indometacina, un inductor de l'expressió de PPAR $\gamma$ . D'altra banda la insulina i els factors de creixement insulínics tipus 1 (IGF-1) també afavoreixen l'adipogènesi, a través de la inducció de CREB i incrementant la captació de glucosa per la formació d'àcids grassos<sup>46,47</sup>.

### 1.3.2. La diferenciació dels adipòcits marrons

La noradrenalina (NE) és una de les principals senyals extracel·lulars inductores de la proliferació i diferenciació dels adipòcits marrons. En cèl·lules precursors i preadipòcits, la NE actua a través dels receptors adrenèrgics  $\beta_1$  induint la proliferació. Un cop determinats, contribueix a incrementar els nivells de cAMP per tal d'activar C/EBP $\beta$  a través de CREB. Com es comenta més endavant, en el cas dels adipòcits madurs la NE actuarà com a principal inductor termogènic a través dels receptors adrenèrgics  $\beta_3$ .<sup>27</sup>

Els adipòcits marrons provenen generalment de precursors *Myf5*<sup>+</sup>. Gran part de la cascada transcripcional necessària per a l'adipogènesi és comú entre adipòcits blancs i marrons, com és el cas de les C/EBPs i PPAR $\gamma$ . A diferència dels adipòcits blancs però, C/EBP $\alpha$  s'expressa abans que C/EBP $\beta$ , i és essencial per la biogènesi mitocondrial i l'adquisició de la capacitat termogènica<sup>48</sup>. Al llarg de la diferenciació els adipòcits marrons adquireixen la capacitat termogènica amb l'expressió d'UCP1, juntament amb gens del metabolisme lipídic i la biogènesi mitocondrial. En aquest sentit i a diferència dels adipòcits blancs, el coactivador de PPAR $\gamma$  1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) i el factor amb dominis PR 16 (PRDM16) jugaran un paper important en l'adquisició del fenotip termogènic.

PRDM16 és una de les proteïnes determinants del fenotip termogènic, essent expressada de manera preferencial en TAM respecte TAB<sup>49</sup>. La pèrdua de l'expressió de PRDM16 en preadipòcits marrons promou la diferenciació mioblàstica en detriment del fenotip termogènic<sup>50</sup>. Per contra, quan es sobreexpressa PRDM16 en preadipòcits blancs o en precursors mioblàstics, aquests adquireixen característiques d'adipòcit

marró i inhibeix l'expressió de gens propis d'adipòcits blancs<sup>51</sup>. PRDM16 és important tant per la diferenciació de l'adipòcit marró com per el manteniment del fenotip termogènic en l'adipòcit madur. Tot i així, la pèrdua de l'expressió de PRDM16 en ratolins té efectes moderats a nivell del desenvolupament embrionari del TAM, podent ésser compensada per d'altres proteïnes com PRDM3<sup>52</sup>.

Un dels punts claus de l'acció de PRDM16 és la interacció amb C/EBP $\beta$ , que indueix PPAR $\gamma$ , PGC1 $\alpha$  i desencadena el programa transcripcional d'adipòcit marró<sup>53</sup>. Més tard és capaç d'interactuar amb el complex PPAR $\gamma$ -RXR i amb PPAR $\alpha$ . A diferència de l'adipòcit blanc, l'expressió de PPAR $\alpha$  coincideix amb l'etapa terminal de la diferenciació adipocitària i és important per al fenotip termogènic, ja que indueix l'expressió de PGC1 $\alpha$  i UCP1 en els adipòcits diferenciats<sup>54-56</sup>.

PGC1 $\alpha$  va ser identificat inicialment com un coactivador de PPAR $\gamma$  expressat de manera preferencial en TAM respecte TAB, i induïble per fred<sup>57</sup>. PGC1 $\alpha$  és el producte del gen *Ppargc1a* i pot presentar diverses isoformes gràcies al procés d'*splicing* alternatiu de les quals, PGC1 $\alpha$ 1 és la que s'ha descrit implicada en el metabolisme dels teixits adiposos, el fetge, i el múscul<sup>58</sup>. Tot i induir-se durant la diferenciació, l'expressió de PGC1 $\alpha$  no és essencial per aquest procés, ja que la seva manca pot ser compensada per l'acció de PGC1 $\beta$ 1; en canvi, en l'adipòcit madur, la manca de PGC1 $\alpha$  sí que redueix severament la inducció del programa termogènic<sup>59</sup>. Alguns dels inhibidors del programa termogènic com la proteïna retinoblastoma (pRb) o RIP140 actuen a través de la inhibició de l'expressió o l'activitat de PGC1 $\alpha$ <sup>45,60</sup>.

En l'adipòcit madur l'expressió de PGC1 $\alpha$  és induïble per fred a través de l'activació de la via p38MAPK i el factor activador de la transcripció 2 (ATF2<sup>61,62</sup>). En els adipòcits marrons i beix PGC1 $\alpha$  activa la transcripció de UCP1, DIO2, i de gens de la cadena respiratòria i la  $\beta$ -oxidació mitocondrial<sup>57,63,64</sup>. Això és gràcies a l'acció d'activador transcripcional que duu a terme a través de la unió amb PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$ , i els receptors de les hormones tiroïdals (entre d'altres)<sup>55,65</sup>.

### **1.3.3. La diferenciació dels adipòcits beix**

Els adipòcits beix apareixen en resposta a estímuls termogènics sostinguts en el temps en els dipòsits de TAB<sup>66</sup>. Existeixen dues teories (no excloents entre elles) sobre la procedència aquests adipòcits multiloculars amb capacitat termogènica en el TAB: la primera es basa en la existència de fenòmens de transdiferenciació d'adipòcits blancs madurs cap a adipòcits beix<sup>67</sup>; la segona es basa en la formació de noves cèl·lules adiposes a través de la diferenciació de precursors (principalment *Myf5*<sup>+</sup>) residents en els dipòsits de TAB<sup>68</sup>.

Per tal de demostrar la teoria de la diferenciació de precursors específics, s'han dut a terme diversos estudis per determinar els llinatges que potencialment poden diferenciar-se en adipòcits beix. S'han pogut aïllar diverses poblacions heterogènies de precursors residents en el TAB amb capacitat de diferenciar-se a adipòcits beix *in vitro*. Aquests precursors adipogènics dels dipòsits de TAB però necessiten ésser estimulats amb activadors termogènics com les tiazolidinediones o agonistes  $\beta$ -adrenèrgics per tal d'activar el programa termogènic<sup>69</sup>. El fenotip beix doncs és induïble, de manera que aquests precursors residents en el TAB poden dur a terme tant funcions d'emmagatzematge com de despesa energètica<sup>70</sup>. Alguns dels marcadors detectats en preadipòcits residents al TAB amb capacitat de diferenciar-se en adipòcits beix són: el factor primerenc de cèl·lula B 2 (EBF2), el receptor de

factors de creixement derivats de plaquetes  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ), la proteïna de dits de zinc 16 (ZFP516), el factor de transcripció de caixes T 15 (TBX15), juntament amb PRDM16 i PGC1 $\alpha$ <sup>69,71,72</sup>. També s'han identificat repressors del *browning* com ZFP423<sup>73</sup>.

Recentment s'ha intentat establir una sèrie de marcadors per tal de poder diferenciar els adipòcits beix dels marrons clàssics un cop diferenciats. Actualment, l'expressió dels gens *Tbx1*, *Tmem26*, *Tnfrsf9*, *Shox2*, *Cited1* es considera típica d'adipòcit beix, mentre l'expressió de *Zic1*, *Lhx8*, *Eva1*, *Ebf3*, es considera típica d'adipòcit marró clàssic. Tot i així, aquesta és encara una qüestió en debat, especialment en el cas de definir la validesa d'aquests marcadors tant en ratolins com en humans.

## **1.4. FUNCIO DEL TEIXIT ADIPÓS**

Com ja hem mencionat, el TAB i el TAM realitzen funcions diferents i antagòniques: per una banda el TAB emmagatzema energia, mentre que per l'altra el TAM és un lloc de despesa energètica. D'aquesta manera ambdós dipòsits juguen un paper essencial en el balanç energètic i en les malalties metabòliques derivades<sup>74</sup>.

La presència de dipòsits adiposos també té funcions estructurals, les quals es troben generalment relacionades amb la protecció de determinades zones, com el globus ocular, el palmell de la mà o el taló; juntament amb la funció d'aïllant tèrmic especialment en el cas del TAB subcutani. El TAB doncs pot contribuir al control de la temperatura corporal d'una manera diferent a la del TAM. Els dipòsits adiposos amb funció estructural es troben distribuïts all llarg de l'organisme i també es poden veure alterats en situacions patològiques, per exemple en el cas de les lipodistrofies.

### **1.4.1. Funció del teixit adipós blanc**

El TAB és el principal lloc d'emmagatzematge d'energia de l'organisme, funcionant com a reservori energètic i també com a tampó per a l'excés d'energia consumida. El TAB és un teixit amb una gran plasticitat ja que es pot expandir enormement gràcies a fenòmens d'hipertròfia (augment de la mida de la adipòcits) i d'hiperplàsia (increment en el nombre d'adipòcits diferenciats). Tot i que el fetge i el múscul també tenen la capacitat d'emmagatzemar energia com a reservori (principalment en forma de glicogen), seran els lípids emmagatzemats en el TAB els que sustentaran les necessitats metabòliques de l'organisme en períodes perllongats de falta de nutrients.

#### **1.4.1.1. Lipogènesi i emmagatzematge de lípids**

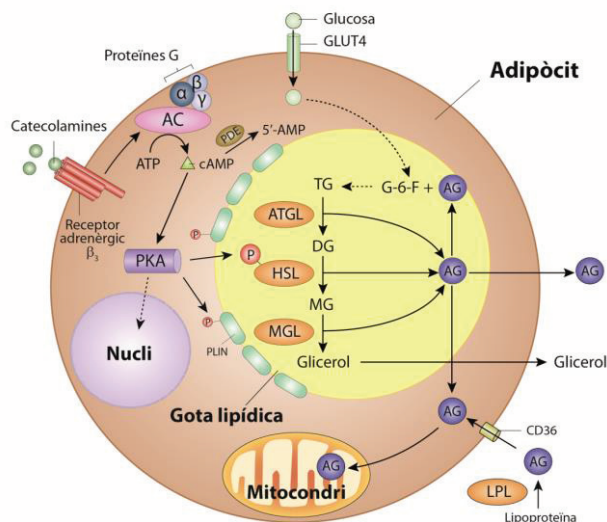
En situacions d'alimentació els lípids que provenen de la dieta són majoritàriament: triglicèrids, alguns àcids grassos lliures, colesterol i d'altres esterols. Els lípids entren al torrent sanguini en forma de quilomicrons (QM). A més a més el fetge pot transformar l'excés de carbohidrats en TG a través de la lipogènesi *de novo* i incorporar-los al torrent sanguini en forma de VLDL (lipoproteïna de molt baixa densitat). Tant els QM com les VLDL distribueixen els lípids per l'organisme, que seran captats per els diferents teixits en forma d'àcids grassos lliures no esterificats (NEFA) gràcies a l'acció de la lipoproteïna lipasa (LPL) de les cèl·lules endotelials i adiposes<sup>75,76</sup>.

Els àcids grassos entren a les cèl·lules principalment a través de transportadors específics: CD36 i la família de transportadors d'àcids grassos FATP<sup>75</sup>. Un cop a dins de les cèl·lules els àcids grassos són esterificats a acil-CoA i emprats com a substrat energètic oxidatiu o, en el cas dels teixits adiposos, poden ser reesterificats en forma de TG per ser incorporats als LD a través de la lipogènesi. Els TG es sintetitzen en el reticle endoplasmàtic i s'acumulen en forma d'agregats fins que aquests són prou grans per escindir-se, donant lloc a la gota lipídica. A l'escindir-se, les LD queden envoltades per una monocapa de fosfolípids i colesterol juntament amb varies proteïnes ancorades, com per exemple l'adipofil·lina, la caveolina 1, les proteïnes de la família de les perilipines (PLIN) o les proteïnes de la família dels factors inductors de mort cel·lular similar al factor de fragmentació del DNA (CIDE). Aquestes proteïnes són importants per l'estructura de la LD i també per regular-ne la dinàmica i els processos de formació-degradació<sup>77</sup>. En el cas dels adipòcits blancs per exemple, les LD es fusionen en una gran vesícula lipídica citoplasmàtica que acaba desplaçant el nucli a la perifèria durant el procés de diferenciació. La proteïna CIDEA és un dels principals reguladors dels processos de fusió, essent a més a més un potent inhibidor de la lipòlisi. Els estímuls termogènics, per exemple, reprimeixen l'expressió de CIDEA per tal d'activar la lipòlisi<sup>78,79</sup>.

La lipogènesi pot ser regulada per senyals hormonals i per factors de creixement. En condicions d'alimentació la insulina indueix la lipogènesi *de novo* per gestionar l'excés de carbohidrats i promou la translocació de GLUT4 a la membrana cel·lular dels adipòcits afavorint la captació de glucosa<sup>80</sup>. A més a més activa els factors de transcripció d'unió a elements d'esterols 1 (SREBP-1), que activen la transcripció de la leptina i de gens implicats en la síntesi de TG com l'enzim FAS. En canvi, en condicions de dejuni, el glucagó inhibeix la lipogènesi i activa la lipòlisi al TAB.

#### **1.4.1.2. Lipòlisi i mobilització de reserves**

Quan l'organisme requereix de la mobilització de les reserves energètiques s'activa la lipòlisi en el TAB, proporcionant àcids grassos lliures als teixits amb demanda energètica. Aquests seran usats principalment com substrat per a la  $\beta$ -oxidació. La caiguda de la ratio insulina-glucagó en el dejuni o l'increment dels nivells de catecolamines activen la hidròlisi dels TG per part de les lipases adiposes donant lloc a àcids grassos lliures i glicerol<sup>81</sup>. L'activació de la lipòlisi s'inicia amb la fosforilació de la lipasa sensible a hormones (HSL), que es transloca a la superfície de la LD, i amb la fosforilació de la perilipina A, que possibilita l'accés de la HSL i d'altres lipases com la ATGL o la MGL a la LD<sup>82,83</sup> (Figura 3). Els àcids grassos generats per la lipòlisi poden entrar als mitocondris per incorporar-se a la  $\beta$ -oxidació gràcies a la llançadora de carnitina i a l'acció de la carnitina-palmitoil transferasa 1 (CPT1)<sup>81</sup>.



**Figura 3. Activació de la lipòlisi.** Les catecolamines actuen sobre els receptors adrenèrgics promovent l'increment de cAMP per l'acció de l'adenil·lat ciclasi (AC). El cAMP activa la PKA que fosforila les perilipines (PLIN) i la HSL, possibilitant la translocació i accés de les lipases a la gota lipídica. La ATGL hidrolitza els triglicèrids (TG) a diglicèrids (DG), la HSL hidrolitza els DG a monoglicèrids (MG), i la MGL hidrolitza els MG a àcids grassos (AG) i glicerol. Els AG poden ser exportats o incorporats a la β-oxidació mitocondrial. (Adaptat de Ref.7)

#### 1.4.1.3. Funció secretora del teixit adipós blanc

Més enllà de la seva funció com a òrgan d'emmagatzematge d'energia, el TAB és un òrgan endocrí que secreta hormones i citocines de gran importància en la regulació de múltiples funcions sistèmiques. Aquests factors secretats, anomenats adipocines poden actuar a nivell autocrí, paracrí i endocrí. Les principals adipocines són:

- **La leptina:** La funció principal de la leptina és el control de la ingesta a nivell del sistema nerviós central<sup>84</sup>. La senyalització de la leptina vehicula diverses respostes sistèmiques coordinades principalment des de l'hipotàlem: com el control de l'apetit, la lipòlisi o la termogènesi. En canvi, els efectes perifèrics de la leptina, estan relacionats amb la sensibilitat a la insulina i amb la regulació del sistema reproductor. Mentre que la deficiència de leptina desencadena un estat d'obesitat, s'ha descrit la obesitat mateixa com un estat de resistència a la leptina<sup>85,86</sup>.
- **L'adiponectina:** L'adiponectina és un sensor de l'estat nutricional que actua incrementant la sensibilitat a la insulina als teixits perifèrics. Entre d'altres accions l'adiponectina, aquesta pot activar la oxidació dels àcids grassos al múscul esquelètic, inhibir la gluconeogènesi al fetge i inhibir la lipòlisi al TAB<sup>87</sup>. A diferència de la leptina, els nivells d'adiponectina es veuen reduïts en situacions de resistència a la insulina, en estats d'inflamació i en l'obesitat<sup>85,88</sup>.
- **Resistina:** La resistina és una adipocina secretada pel TAB la funció de la qual es troba majoritàriament relacionada amb el metabolisme de la glucosa i amb processos inflamatoris. En humans és secretada per les cèl·lules del sistema immunològic del TAB; mentre que en ratolins és produïda pels adipòcits blancs. En condicions patològiques com en el cas de la obesitat, contribueix a promoure la resistència a la insulina<sup>89</sup>.

A més a més de les principals adipocines mencionades, el TAB secreta una varietat de molècules reguladores: l'adipsina, l'apelina, l'omentina, la proteïna d'unió a retinol 4 (RBP4), la vaspina o la visfatina; a més a més dels NEFA provinents de la lipòlisi, que també poden actuar com a molècules senyalitzadores. D'altra banda el TAB és



també un òrgan productor d'una gran quantitat de citocines i quimiocines secretades per la SVF principalment (però no exclusivament). En el cas de les citocines antiinflamatòries, aquests tindrien un rol relacionat amb el manteniment de la homeòstasi del teixit; en situacions d'obesitat però, es dona un increment de la producció de citocines proinflamatòries en resposta a l'estrès del microambient tissular (estrès oxidatiu, hipòxia, etc.) donant lloc a un estat d'inflamació crònica<sup>90,91</sup>.

#### **1.4.2. Funció del teixit adipós marró**

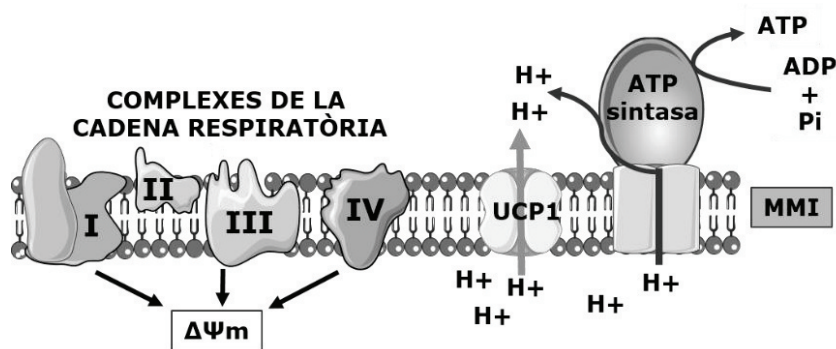
El TAM és on té lloc principalment la termogènesi adaptativa, un mecanisme adaptatiu de producció de calor per tal de mantenir la temperatura corporal especialment en condicions de baixes temperatures ambientals. L'existència del TAM va ser descrita per primera vegada en petits mamífers que duen a terme processos d'hibernació, per això es va anomenar glàndula d'hibernació<sup>92</sup>. La presència de TAM actiu en humans es va identificar inicialment en nadons, degut al fet de que aquests, a diferència dels adults, posseeixen grans quantitats de TAM especialment en la zona interescapular. En els humans adults les zones de TAM i *browning* tenen una distribució més dispersa que en els nadons<sup>15</sup>.

El TAM és un teixit molt innervat ja que l'activació de la termogènesi està controlada per les terminals nervioses de les neurones noradrenèrgiques que provenen de l'hipotàlem<sup>93</sup>. També es troba altament irrigat ja que per una banda extrau oxigen i substrats metabòlics del torrent sanguini, i per l'altra transmet l'escalfor que genera per tot el cos a través de la sang<sup>27</sup>. Els processos de *browning* estan acompanyats d'un increment en la irrigació i la innervació dels dipòsits de TAB en les zones on apareixen adipòcits beix.

El TAM juga un paper important en la regulació de la despesa energètica gràcies a l'elevada capacitat oxidativa. L'activació de la termogènesi en el TAM és un mecanisme de protecció contra l'obesitat i les malalties relacionades ja que permet cremar substrats metabòlics i evita que s'acumulin en forma de greix<sup>94</sup>. Un dels estímuls activadors de la termogènesi és la pròpia ingesta d'aliments en el que s'anomena termogènesi induïda per la dieta, controlada en part per l'activació postprandial del sistema nerviós simpàtic<sup>95</sup>. En l'obesitat l'activitat del TAM es troba sistemàticament reduïda<sup>96</sup>.

##### **1.4.2.1. UCP1 i el mecanisme de producció de calor**

La capacitat termogènica dels adipòcits marrons ve donada per l'expressió de la proteïna UCP1 (també nombrada inicialment termogenina)<sup>97</sup>. L'acció d'UCP1 té lloc a la membrana mitocondrial interna, on catalitza un flux de protons des de l'espai intermembrana fins a la matriu mitocondrial (Figura 4). La pèrdua de protons dissipa el gradient electroquímic generat per la cadena respiratòria i, d'aquesta manera, l'acció de la cadena respiratòria queda desacoblada de la fosforilació oxidativa i la formació d'ATP. A la majoria de cèl·lules que no expressen UCP1, el gradient electroquímic només pot ser dissipat per la ATP sintasa per tal de generar ATP. L'acció d'UCP1 accelera la oxidació mitocondrial de substrats energètics evitant alhora l'acumulació d'ATP (que normalment acabaria inhibint el catabolisme mitocondrial) i generant calor. Tot i que hi ha altres membres en la família de les proteïnes desacobladores, UCP1 és essencial per la termogènesi<sup>98,99</sup>.



**Figura 4. Permeabilitat de protons mitjançada per UCP1.** UCP1 es troba a la membrana mitocondrial interna (MMI), transloca els protons ( $H^+$ ) des de l'espai intermembrana a la matriu mitocondrial, disminuint el potencial de membrana ( $\Psi_m$ ) generat per els complexos de la cadena respiratòria.

#### 1.4.2.2. La termogènesi adaptativa

El principal estímul fisiològic que activa la termogènesi en els adipòcits marrons és la disminució de la temperatura ambiental. En condicions de termoneutralitat, quan el metabolisme basal és suficient per generar la calor necessària per al manteniment de la temperatura corporal, el TAM s'inactiva adquirint algunes característiques de TAB, com la fusió de LD i la pèrdua de proteïna mitocondrial<sup>100</sup>. La zona de termoneutralitat varia segons l'organisme, ja que la generació i dissipació d'energia calorífica depèn de la relació superfície/volum, de la capacitat d'aïllament i del metabolisme basal. En ratolins adults, es troba al voltant de 30°C<sup>101</sup>.

Davant d'un estímul de fred l'organisme activa varies respostes adaptatives que dependran de la intensitat i durada del fred. Les respostes agudes estan mitjançades per un increment en l'activitat simpàtica, que desencadena una ràpida vasoconstricció perifèrica, la producció de calor muscular per tremolor, i l'activació de la termogènesi en el TAM (acompanyat d'un increment del flux sanguini cap al teixit)<sup>27,102</sup>. La capacitat termogènica del TAM en aquest moment dependrà dels nivells d'UCP1 existents: en condicions de termoneutralitat són molt baixos, si l'organisme ha estat prèviament adaptat al fred i presenta uns nivells basals elevats d'UCP1 la resposta termogènica serà més ràpida<sup>101</sup>. Davant d'estímuls perllongats en el temps s'activa la síntesi de proteïnes del programa termogènic i d'enzims implicats en la lipòlisi i la  $\beta$ -oxidació en el TAM, juntament amb el reclutament de nous adipòcits marrons (hiperplàsia) i s'indueix el *browning*.

### 1.5. REGULACIÓ DE LA TERMOGÈNESI ADAPTATIVA EN EL TAM

L'activitat del TAM està regulada a nivell central per l'hipotàlem, principalment per l'àrea preòptica i el nucli ventromedial<sup>93</sup>. L'hipotàlem controla l'activitat de les terminacions nervioses simpàtiques que innerven els teixits adiposos de manera que la percepció de les senyals de fred desencadena l'alliberament de noradrenalina (NE) per part d'aquestes neurones i l'activació de la termogènesi. Recentment s'ha descrit com algunes cèl·lules del sistema immunitari residents en els teixits adiposos poden contribuir a l'estímul termogènic secretant NE<sup>103</sup>.

#### 1.5.1. Regulació noradrenèrgica

La noradrenalina o norepinefrina (NE) és el principal inductor de l'activitat del TAM a través de l'acció sobre els receptors adrenèrgics dels adipòcits marrons. Tot i que els adipòcits marrons expressen a la membrana plasmàtica receptors  $\alpha$  i  $\beta$ -adrenèrgics, el receptor  $\beta_3$  és el que s'expressa majoritàriament essent el principal mediador de

la senyal termogènica induïda per NE. El receptor  $\beta_1$  s'expressa en preadipòcits i és important per la hiperplàsia del teixit induïda per fred<sup>27</sup>. Els receptors  $\beta$ -adrenèrgics són receptors transmembrana acoblats a proteïnes G. En els adipòcits madurs, els receptors  $\beta_3$  generalment estan acoblats a proteïnes  $G_{s\alpha}$ , tot i que també poden senyalitzar a través de  $G_i$  per l'activació de la via de les cinases activades per mitògens (MAPK) i de les cinases regulades per senyals extracel·lulars ERK<sup>104</sup>.

Davant d'un estímul de fred, la NE alliberada en el TAM activa els receptors  $\beta_3$ -adrenèrgics que, a través de les proteïnes-G, promourà l'activació de l'adenilat ciclase i la conseqüent producció de cAMP. L'increment de la concentració de cAMP pot modular diverses vies de senyalització, en el cas dels adipòcits marrons l'activació de la termogènesi té lloc gràcies a l'activació de la proteïna cinasa A (PKA)<sup>27,105</sup>.

Un cop activada, la PKA duu a terme varies accions: activa la lipòlisi gràcies a la fosforilació de les PLIN i de HSL; activa les vies de les MAPK, ERK1/2 i p38; i activa el programa genètic termogènic a través del factor de transcripció de resposta a cAMP (CREB) i d'ATF2<sup>62,106</sup>. La PKA pot activar aquests factors de transcripció de manera directa o mitjançant p38MAPK. CREB i ATF2 activen la transcripció de gens que contenen els elements de resposta CRE, com UCP1 o PGC1 $\alpha$ . A més a més p38MAPK fosforila PGC1 $\alpha$  de manera que aquest pot actuar de coactivador transcripcional de UCP1 mitjançant altres elements que s'uneixen al promotor d'UCP1.

### **1.5.2. Regulació endocrina i nutricional**

Tot i que el principal regulador de la termogènesi és el sistema nerviós simpàtic, existeixen diversos reguladors no-adrenèrgics de l'activitat termogènica del TAM.

Durant el desenvolupament de la present tesis s'han dut a terme dues col·laboracions en treballs relacionats amb la regulació de la termogènesi per factors no adrenèrgics: una col·laboració en l'elaboració d'una revisió en la qual s'aprofundeix sobre aquests conceptes; i una col·laboració en la qual es descriuen els efectes dels àcids grassos poliinsaturats omega-3 en l'activació termogènica del TAM i el *browning* del TAB. Ambdues s'inclouen més endavant.

#### **1.5.2.1. Regulació per hormones tiroïdals**

Els adipòcits marrons són capaços de produir triiodotironina (T3) a partir de tiroxina (T4) gràcies a l'expressió de l'enzim tiroxina 5'-desiodasa de tipus 2 (DIO2) que s'indueix per NE<sup>107,108</sup>. La T3 és essencial per l'activació termogènica en el fred i actua de manera sinèrgica amb la NE incrementant els nivells d'cAMP, induint la lipòlisi i la oxidació mitocondrial. A nivell intracel·lular la T3 activa la transcripció de gens termogènics com UCP1 a través del receptor d'hormones tiroïdals (TR). A nivell sistèmic la T3 regula l'activitat del TAM de manera indirecta a través de l'hipotàlem, on activa l'activitat simpàtica<sup>109</sup>.

#### **1.5.2.2. Regulació per FGF21**

FGF21 és un factor endocrí de la família dels factors de creixement fibroblàstics (FGF) principalment secretat per el fetge. FGF21 té accions reguladores en els teixits adiposos, on induïx de la lipòlisi i la captació de glucosa. L'acció d'FGF21 sobre el TAM és d'activació de la termogènesi a través de la unió amb els receptors de FGF (FGFR) i el correceptor  $\beta$ -Klotho, promovent l'expressió de PGC1 $\alpha$ , d'UCP1, i



GLUT4<sup>110</sup>. L'adipòcit marró també secreta FGF21 (i en rosegadors també l'adipòcit blanc) especialment com a fruit de la inducció termogènica, actuant de manera autocrina i paracrina en el TAM<sup>111</sup>, però també duent a terme accions endocrines principalment en el TAB (*browning*)<sup>112</sup>. Recentment s'ha descrit com els efectes centrals d'FGF21 podrien mitjançar part dels efectes sobre la termogènesi a través de l'activació del sistema simpàtic<sup>113</sup>.

### **1.5.2.3. Regulació per àcids biliars i l'eix fetge-intestí**

El fetge és capaç de modular l'activitat del TAM a través de la secreció d'àcids biliars els quals, a part de possibilitar l'absorció intestinal de lípids, actuen com a molècules senyalitzadores. Els àcids biliars tenen accions directes sobre els adipòcits marrons ja que s'uneixen al receptor acoblat a proteïnes-G TGR5, induint l'expressió de DIO2<sup>114</sup>. A més a més els àcids biliars poden activar la termogènesi de manera indirecta a través de les accions que tenen en l'intestí. En primer lloc, estimulen la secreció d'FGF15 (FGF19 en humans) mitjançant l'activació del receptor X farnesoides (FXR). Tot i que la funció principal d'FGF15 és la regulació de la secreció d'àcids biliars en el fetge, FGF15 pot estimular l'activitat del TAM i promoure el *browning* del TAB a través de la unió a FGFR i  $\beta$ -Klotho de manera similar a FGF21<sup>115</sup>.

En segon lloc, els àcids biliars indueixen la secreció intestinal del pèptid similar a glucagó 1 (GPL-1), una incretina alliberada per l'intestí amb accions anti-diabètiques. De fet, anàlegs farmacològics del GLP-1, com la luraglutida són d'ús comú per el tractament de la diabetis tipus II. En ratolins s'ha vist com el tractament amb luraglutida incrementa la termogènesi i especialment el *browning* del TAB, principalment però degut a efectes centrals sobre l'hipotàlem<sup>116</sup>.

### **1.5.2.4. Regulació per senyals musculars i cardíacs**

L'exercici és un conegut estímul inductor de la termogènesi i el *browning* del TAB. El múscul esquelètic és capaç de produir múltiples molècules secretables anomenades miocines, algunes de les quals han estat reconegudes com a inductores del *browning* del TAB i estimuladores de la termogènesi, com la Irisina (Bostrom 2012) i l'àcid  $\beta$ -aminoisobutíric (BAIBA)<sup>117</sup>. Recentment s'ha proposat una altra miocina potencialment inductora de la termogènesi del TAM, la *musclina*<sup>118</sup>. En el cas de la Irisina s'ha proposat que els efectes activadors termogènics que duu a terme podrien ser un mecanisme evolutiu derivat de l'estrès muscular degut a tremolor, ja que a part de l'exercici, el fred també incrementa els nivells d'Irisina circulants<sup>119</sup>. S'ha proposat que la secreció muscular d'FGF21 degut a estrès mitocondrial, també podria participar en l'activació termogènica del TAM<sup>120</sup>.

Els pèptids natriurètics articular (ANP) i ventricular (BNP) són factors secretats pel cor (cardiomiocines) involucrats en la regulació de funcions del sistema vascular. Els adipòcits marrons expressen els receptors dels pèptids natriurètics, de manera que també en són diana. Quan s'uneixen als receptors en el TAM, els pèptids natriurètics indueixen la via de senyalització de cGMP-PKG que, com en el cas de la via cAMP-PKA, convergeix en l'activació de la p38MAPK, que com ja hem vist anteriorment és una de les principals vies activadores del programa transcripcional termogènic<sup>121</sup>.

### **1.5.2.5. Regulació per factors de la dieta**

L'activitat del TAM i el *browning* del TAB poden ser modulats per factors presents en la dieta, la identificació dels quals té un gran interès tant per la indústria alimentària com farmacèutica. El concepte de termogènesi induïda per la dieta es troba generalment associat a la ingesta de dietes amb un alt contingut en greixos i d'elevada aportació calòrica. La composició específica d'aquests greixos o la presència de determinades molècules bioactives determinen la capacitat d'inducció termogènica més enllà dels efectes aguts postprandials.

- **Regulació per àcid retinoic:** L'àcid retinoic és un derivat de la vitamina A implicat en els fenòmens de diferenciació dels adipòcits marrons i capaç d'activar la termogènesi i d'induir el *browning* del TAB. L'àcid retinoic actua a través del receptors nuclear de l'àcid retinoic (RAR) i el receptor X de retinoides (RXR), activant la transcripció d'UCP1 i la diferenciació adipocitària per unió als PPARs respectivament. De fet, en situacions d'activació termogènica, la NE indueix la sobreexpressió de la proteïna d'unió a retinol-4 (RBP4) en adipòcits marrons per tal de captar el retinol circulant<sup>122</sup>. Estudis realitzats en ratolins han descrit com la falta de vitamina A en la dieta redueix l'activitat del TAM<sup>123</sup>.
- **Regulació per polifenols:** El resveratrol és un polifenol d'origen vegetal present en diversos aliments característics de la dieta mediterrània com el raïm (i el vi negre) o els fruits secs. Diversos estudis han demostrat la capacitat de les dietes suplementades amb resveratrol d'induir l'activitat del TAM i el *browning* del TAB, incrementant l'expressió d'UCP1 i de la sirtuïna 1 (SIRT1), amb efectes potenciadors de la termogènesi<sup>124</sup>.
- **Regulació per capsaïcina:** La capsaïcina és un alcaloide lipofílic de la família dels *capsicinoides* responsable dels efectes picants d'alguns pebrots. S'ha demostrat que la ingesta de *capsicinoides* incrementa el consum energètic i redueix l'adipositat tant en ratolins com en humans degut a un increment en el reclutament i activació dels adipòcits marrons<sup>125</sup>. Part dels efectes termogènics de la capsaïcina podrien derivar de l'activació simpàtica hipotalàmica com a reflex de l'activació dels canals iònics responsables de la sensació picant de la llengua (receptor de potencial transitori V1, TRPV1)<sup>126</sup>. Tot i així la capsaïcina podria tenir efectes directes sobre les cèl·lules adiposes ja que s'ha descrit que les cèl·lules adiposes poden expressar múltiples receptors TPR, entre els quals es troba TPRV1 o els receptors sensorials de resposta al fred<sup>127</sup>.

#### **1.5.2.6. Regulació de la termogènesi adaptativa a través de la funció secretora del TAM**

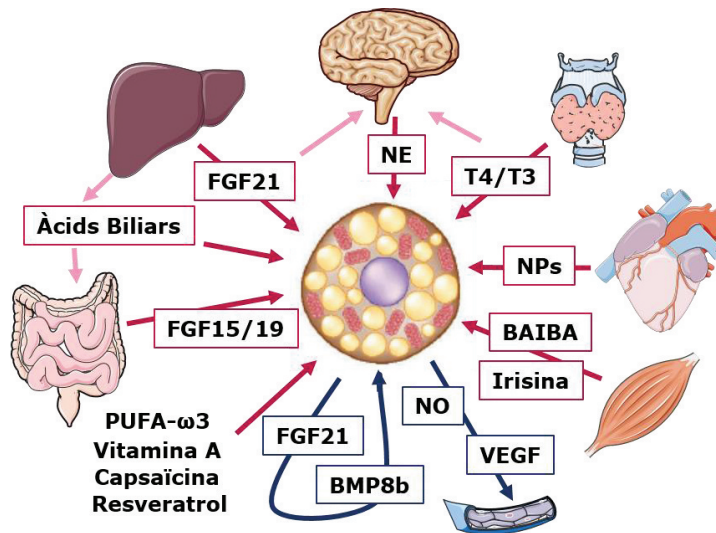
La caracterització del secretoma del TAM és un dels principals punts d'interès actuals en la recerca de noves teràpies per lluitar contra l'obesitat. A diferència del TAB, la visió del TAM com a òrgan secretor és un concepte recent. Això és degut a que les principals adipocines que havien estat caracteritzades en el TAB, com la leptina o citocines proinflamàtòries, s'expressen molt poc en el TAM, de manera que s'havia assumit que la funció secretora del TAM era de poca importància. El canvi de paradigma en la visió del TAM com a òrgan secretor de rellevància es va iniciar amb la caracterització de diverses senyals provinents dels adipòcits marrons que duen a terme funcions principalment paracrines i autocrines, propiciant la remodelació del teixit i la màxima activació termogènica. S'han identificat funcions endocrines en algunes d'aquestes molècules secretades pel TAM, essent el TAB i el sistema nerviós

central les principals dianes, ja que generalment desenvolupen funcions relacionades amb la termogènesi. S'ha descrit però que el fetge, el pàncrees, el cor o els ossos també responen a algunes de les senyals provinents del TAM. Aquestes senyals, recentment anomenades batocines, es troben principalment induïdes durant els processos de diferenciació i d'activació termogènica, activant a nivell autocrí i paracrí vies de senyalització en els adipòcits madurs i preadipòcits, en l'epiteli vascular, el sistema nerviós, i el sistema immunitari<sup>128</sup>.

- **Sistema nerviós simpàtic perifèric:** La secreció del factor de creixement de nervis (NGF) i el factor de creixement fibroblàstic 2 (FGF2) estimulen la innervació dels dipòsits de TAM, afavorint la senyalització simpàtica especialment durant la hiperplàsia del teixit<sup>129</sup>.
- **Sistema vascular:** La irrigació sanguínia del TAM és essencial per al desenvolupament de la funció termogènica. Per tal d'incrementar el reg sanguini, els adipòcits marrons alliberen òxid nítric (NO) promovent una vasodilatació local en la microcirculació del TAM. Per tal d'estimular el creixement vascular i incrementar els nivells de perfusió sanguínia, els adipòcits marrons secreten el factor de creixement de l'endoteli vascular A (VEGFA), possibilitant l'activació màxima del teixit durant l'adaptació al fred<sup>130</sup>. VEGFA podria estar realitzant a més a més accions autocrines importants per la funció mitocondrial durant l'activació termogènica<sup>131</sup>.
- **Adipòcits madurs i preadipòcits:** Alguns membres de la família de les proteïnes morfogèniques òssies (BMP) poden ser secretats pel TAM i en regulen els processos de diferenciació i funció, com BMP7 i BMP8b<sup>37,132</sup>. BMP7 s'expressa majoritàriament en les cèl·lules de la SVF induint la diferenciació dels adipòcits marrons i activant el catabolisme de lípids en els adipòcits madurs. A més a més BMP7 duu a terme accions centrals que regulen la termogènesi. De la mateixa manera BMP8b té efectes locals i centrals en el control de la termogènesi, en aquest cas però els productors de BMP8b són els adipòcits marrons en resposta a estímuls termogènics i nutricionals. BMP8b sensibilitza els adipòcits a l'acció de la NE i afavoreix l'activació simpàtica a través de l'hipotàlem.

Com hem comentat prèviament, els adipòcits marrons secreten FGF21, que duu a terme accions tant autocrines i paracrines en el TAM, com endocrines induint el *browning* del TAB i actuant a nivell hipotalàmic. FGF21 té efectes beneficiosos en el metabolisme ja que promou la captació de glucosa en els teixits adiposos i afavoreix la termogènesi en el TAM.

- **Sistema immunològic:** La secreció de citocines antiinflamatòries en el TAM majoritàriament té lloc gràcies a les cèl·lules immunitàries residents en el teixit com a mecanisme de regulació homeostàtica tissular. S'ha descrit com algunes d'aquestes cèl·lules immunitàries poden participar en l'activació termogènica i especialment en el *browning* del TAB a través de la secreció de NE (eosinòfils i macròfags)<sup>103</sup>. Durant l'activació termogènica els adipòcits marrons també secreten varies citocines amb efectes positius sobre la termogènesi, com les interleucines IL1, IL6, o la proteïna similar a la meteorina (Mtrnl), actuant en part sobre els macròfags i afavorint-ne el fenotip antiinflamatòri M2<sup>133,134</sup>.



**Figura 5. Principals reguladors endocrins, paracrins, autocrins i nutricionals de la funció del TAM.**

Alguns dels principals factors reguladors de l'activitat termogènica del TAM poden actuar de manera directa sobre l'adipòcit marró o indirecta, per exemple, sobre el sistema vascular o el control central hipotalàmic de la termogènesi. En vermell s'indiquen els principals factors endocrins i nutricionals que activen la termogènesi; en rosa s'indiquen accions indirectes que acaben activant el TAM; en blau s'indiquen els factors autocrins i paracrins. (Adaptat de Ref. 70)

Cal esmentar que s'han descrit varies molècules secretades pel TAM en resposta al fred amb accions inhibidores de la termogènesi (sLR11 o endocannabinoids), la funció de les quals es sospita que seria prevenir la sobreactivació del teixit com a mecanisme d'homeòstasi tissular.

## 2. L'AUTOFÀGIA

---

L'autofàgia és un procés catabòlic per el qual una cèl·lula pot degradar diversos substrats citoplasmàtics mitjançant la incorporació d'aquests substrats al lisosoma. Dins dels lisosomes, aquest substrats són degradats i les macromolècules resultants poden ser reciclades. L'autofàgia té un paper essencial per a la supervivència de la cèl·lula especialment durant períodes de falta de nutrients, ja que permet una ràpida obtenció de substrats metabòlics a través de la degradació d'òrgànuls, proteïnes i reserves energètiques pròpies de la cèl·lula (glicogen, lípids, etc.), alhora que permet reciclar aminoàcids per a la síntesi de proteïnes essencials per a la supervivència cel·lular. És per això que és un procés conservat evolutivament des dels llevats fins als mamífers<sup>135</sup>. L'autofàgia juga també un paper important en el manteniment de l'homeòstasi cel·lular i durant els processos de remodelació i diferenciació, ja que permet eliminar òrgànuls innecessaris o disfuncionals i, juntament amb la via de degradació proteasomal, contribueix a regular els nivells estacionaris de determinades proteïnes. Durant els últims anys, l'estudi de l'autofàgia en humans i en models animals ha experimentat una gran expansió degut a la relació que s'ha pogut establir entre l'alteració en els processos autofàgics i diverses malalties humanes com el càncer, les malalties neurodegeneratives, l'envelliment, l'obesitat o la diabetis<sup>136</sup>. Aquest fet ha estat possible gràcies a la identificació dels gens i proteïnes implicades, possibilitant un canvi de paradigma en la comprensió de moltes patologies humanes. Yoshinori Ohsumi, responsable de la identificació de varis d'aquests gens durant la dècada dels 90, ha estat guardonat amb el Premi Nobel de Fisiologia o Medicina 2016, dues dècades després de que el científic belga Christian de Duve rebés el mateix premi pel descobriment dels lisosomes<sup>137,138</sup>.

### 2.1. TIPUS D'AUTOFÀGIA

Existeixen diversos tipus d'autofàgia, classificades segons els mecanismes per els quals els substrats de degradació són incorporats als lisosomes: la microautofàgia, la macroautofàgia i l'autofàgia facilitada per xaperones (o CMA, *chaperone-mediated autophagy*) (Figura 6).

#### 2.1.1. La microautofàgia

La microautofàgia consisteix en la degradació de porcions de citoplasma que es troben en les proximitats dels lisosomes, a través d'una invaginació de la membrana del propi lisosoma. El procés d'invaginació dona lloc a una vesícula que queda atrapada juntament amb el seu contingut en el lumen del lisosoma, formant lisosomes multivesiculars. Finalment, tant vesícula com contingut són degradats per les proteases lisosomals. D'aquesta manera poden ser degradades proteïnes, agregats proteics o fins hi tot òrgànuls sencers. Dels tres tipus d'autofàgia, la microautofàgia, tot i haver-se descrit per primera vegada al 1966 juntament amb la macroautofàgia, és de la que se'n coneixen menys aspectes, sobretot en quant a regulació i significança biològica<sup>139,140</sup>. La major part dels estudis que s'han realitzat fins ara s'han centrat en la mecànica del procés i s'han dut a terme majoritàriament en llevats.

La microautofàgia en llevats pot tenir lloc tant de forma no selectiva com de forma selectiva (degradació específica d'òrgànuls). S'han descrit diversos tipus de microautofàgia selectiva: micromitofàgia (mitocondris), la micronucleofàgia



(porcions de nucli), i la microperoxifàgia (peroxisomes). Recentment, s'han identificat processos de microautofàgia en llevats i també en cèl·lules de mamífer associats a la formació d'endosomes tardans multivesiculars (MVBs), en el que s'ha anomenat microautofàgia endosomal (eMI). La eMI requereix de l'acció de proteïnes pròpies tant de la via endosomal com de la via autofàgica, ja que transporta selectivament proteïnes solubles als endosomes tardans<sup>141,142</sup>.

### **2.1.2. La macroautofàgia**

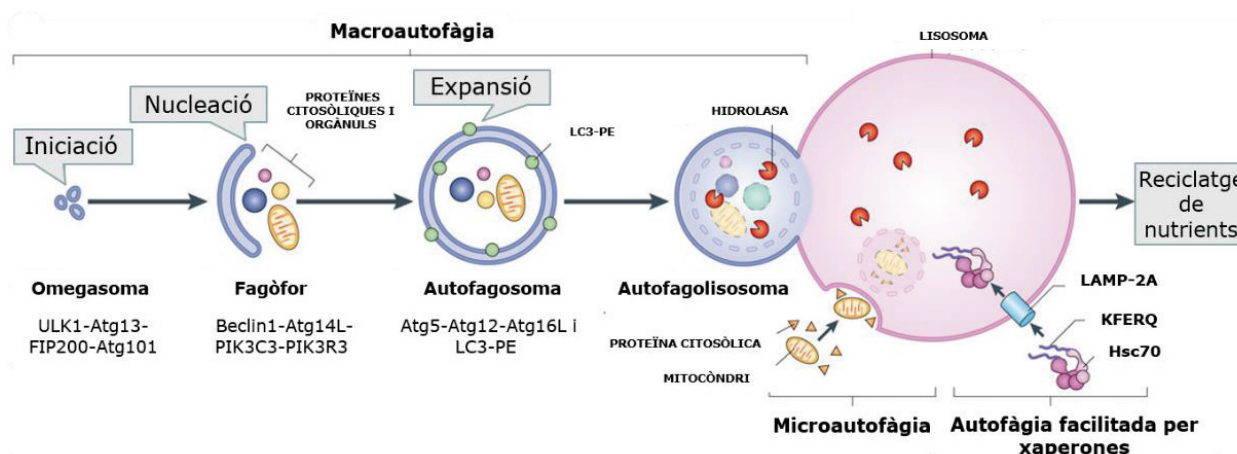
La macroautofàgia es caracteritza per la formació de vesícules de doble membrana (anomenats autofagosomes) que envolcallen porcions de citoplasma que contenen el material cel·lular a ser degradat. Entre els diversos substrats de degradació podem trobar orgànuls cel·lulars, proteïnes citoplasmàtiques, agregats proteics o inclús agents patògens invasors. Els autofagosomes es fusionen amb els lisosomes formant autofagolisosomes, on té lloc la degradació del contingut<sup>143</sup>.

La macroautofàgia consta de diverses fases: activació, formació i elongació de l'estructura de doble membrana, reconeixement dels substrats (si s'escau), formació de la vesícula, i fusió amb el lisosoma<sup>144</sup>. Per tal de dur a terme aquestes fases es requereix de la participació de diverses proteïnes, les quals seran el substrat de regulació del procés. Les principals proteïnes de la maquinària macroautofàgica són anomenades proteïnes relacionades amb l'autofàgia (Atg). Les primeres proteïnes Atg es van identificar en llevats i més endavant s'han identificat les proteïnes homòlogues en mamífers<sup>137</sup>. Com veurem més endavant, aquestes proteïnes s'organitzen en complexos funcionals que participen en les diverses fases del procés macroautofàgic<sup>145-147</sup>.

Els objectius d'aquesta tesi es centren en els processos macroautofàgics que tenen lloc en el teixit adipós marró. Un cop descrits els tres tipus d'autofàgia farem servir el terme genèric "autofàgia" com a substitutiu de macroautofàgia per simplificar la nomenclatura, com és comú trobar en la literatura.

### **2.1.3. L'autofàgia facilitada per xaperones (CMA)**

En el cas de l'autofàgia facilitada per xaperones (CMA), només poden ser degradades proteïnes citoplasmàtiques solubles que contenen un motiu peptídic específic (KFERQ). Aquest motiu peptídic és reconegut per la proteïna de xoc tèrmic de 70kDa (Hsc70), una xaperona citosòlica, formant un complex que posteriorment serà reconegut per la proteïna de membrana associada a lisosomes 2A (LAMP-2A). Les proteïnes que contenen el motiu KFERQ o motius similars a KFERQ doncs, són putatius substrats de degradació per CMA. L'exposició del motiu a les xaperones citosòliques és un dels punts de regulació (conformacional) del procés, així com la fosforilació o acetilació d'alguns residus de motius similars a KFERQ per fer-los reconeixibles per Hsc70<sup>148</sup>. Un cop el substrat interacciona amb LAMP-2A (normalment disposat en monòmers) aquest multimeritza i forma un complex multiproteic associat a una forma de Hsc70 resident al lisosoma (lys-Hsc70) que permet la translocació del substrat al lumen. La capacitat d'una cèl·lula de degradar proteïnes a través de la CMA pot ser regulada a través del control dels nivells de LAMP-2A: transcripcionalment, regulant-ne la degradació en els propis lisosomes, o modulant-ne la dinàmica en els complexos de translocació de la membrana lisosomal.<sup>149-151</sup>



**Figura 6. Vies de degradació autofàgica.** Esquema representatiu dels tres tipus d'autofàgia (macroautofàgia, microautofàgia i autofàgia facilitada per xaperones) i de les principals proteïnes i events que tenen lloc fins a la fusió amb el lisosoma. Els lisosomes competents per l'autofàgia mediada per xaperones necessiten expressar LAMP-2A a la membrana. (Adaptat de Ref. 208)

## 2.2. LA MAQUINÀRIA AUTOFÀGICA

El primer punt de regulació de l'autofàgia és la iniciació de la membrana que rodejarà el material a ser degradat (fagòfor). La cèl·lula ha de ser capaç de controlar tant els llocs de formació dels fagòfors (prop del substrat de degradació) com el moment en què això succeeix. D'aquesta manera, els primers passos per iniciar el procés autofàgic tenen una regulació tant espacial com temporal.

La inducció del procés de formació del fagòfor s'anomena nucleació i és un dels punts principals de regulació del procés. Com s'explica més endavant, un cop iniciada la nucleació tenen lloc dues cascades de conjugació, amb varies proteïnes Atg implicades, que generen el fagòfor pròpiament dit. Finalment, aquesta estructura s'elonga i es tanca al voltant del material a degradar donant lloc a l'autofagosoma (Figura 6).

### 2.2.1. Els complexos de nucleació

El procés de nucleació és dut a terme per varies proteïnes estructurades en forma de complexos. Els complexos de nucleació que inicien la formació de la doble membrana són: (i) complex ULK1 (ii) complex PI3KC3.

#### 2.2.1.1. El complex ULK1

El complex ULK1 està format per la cinasa activadora de l'autofàgia similar a unc-51 1 (ULK1), Atg13, la proteïna d'interacció amb les cinases d'adhesió focal 200 (FIP200) i Atg101<sup>152,153</sup>. Els mecanismes d'activació de l'autofàgia promouen l'activació d'ULK1, que fosforila a Atg13 i a FIP200, donant lloc a l'activació completa del complex i el reclutament del segon complex de nucleació: el complex fosfatidilinositol 3 cinasa classe III (PI3KC3).<sup>154</sup> S'ha descrit com ULK2 (homòleg d'ULK1) també pot dur a terme funcions redundants a ULK1, almenys en condicions de dejuni.

### 2.2.1.2. El complex PIK3C3

El segon pas de la formació del fagòfor és l'activació del complex de nucleació PI3KC3, que està format per la interacció entre les proteïnes Beclin 1, PIK3C3, i la subunitat reguladora 4 de la PIK3 (PIK3R4). Aquestes proteïnes formen el nucli del complex, la localització i activitat del qual es troben regulades per interaccions amb altres proteïnes. Les proteïnes Atg14L i la molècula activada en l'autofàgia regulada per Beclin1 (AMBRA1) interaccionen amb Beclin 1 promovent la translocació del complex a la zona de nucleació. Un cop allà, ULK1 fosforila Beclin 1 activant la funció cinasa lipídica de PIK3C3<sup>155</sup>.

El complex PIK3C3 activat genera fosfatidilinositol-3-fosfat (PI<sub>3</sub>P) en les zones d'iniciació del fagòfor, promovent el reclutament de les proteïnes Atg. Els fagòfors es formen en dominis de membrana rics en PI<sub>3</sub>P, generalment situats en el reticle endoplasmàtic (RE). Aquestes zones de nucleació s'anomenen omegasomes<sup>156</sup>. L'enriquiment en PI<sub>3</sub>P genera zones d'ancoratge per la resta de maquinària autofàgica i possibilita la curvatura de la membrana per generar el fagòfor.

### 2.2.2. La formació del fagòfor

La formació de la doble membrana dels autofagosomes requereix de l'aportació de fosfolípids. Com ja s'ha mencionat, l'inici del fagòfor té lloc a zones del ER riques en PI<sub>3</sub>P, de manera que els lípids que conformen la membrana del fagòfor provindrien preferencialment del RE. També s'ha proposat que les membranes dels autofagosomes podrien provenir de membranes mitocondrials, de la membrana plasmàtica o de membranes vesiculars<sup>157,158</sup>. De fet, actualment es creu que les vesícules que contenen Atg9a podrien contribuir en l'aportació de lípids de membrana, tot i que es desconeixen els mecanismes exactes per els quals serien reclutades<sup>159</sup>. La proteïna Atg9a és una de les poques proteïnes de la família dels Atg's amb domini transmembrana i s'ha vist que juga un paper essencial per la formació dels autofagosomes. Atg9a es troba associada a diverses membranes cel·lulars com endosomes i vesícules *trans*-Golgi i, quan l'autofàgia s'activa, forma part de l'omegasoma<sup>160</sup>. Cal dir però, que la procedència de les membranes i la manera exacta com la vesícula autofàgica es genera són qüestions encara poc conegudes.

### 2.2.3. Les cascades de conjugació

Per la formació del fagòfor i la seva elongació fins a tancar-se sobre si mateix formant l'autofagosoma, són necessàries dues cascades de conjugació similar a ubiquitina (*Ub-like*) seqüencials: (i) la cascada de conjugació Atg12-Atg5 (ii) i la cascada de conjugació de la cadena lleugera 3 de la proteïna associada a microtúbuls 1 (LC3). En cadascuna d'elles hi participa un enzim de conjugació *E1-like*, un enzim de conjugació *E2-like* i en el cas de LC3, un enzim *E3-like* lligasa.

#### 2.2.3.1. La cascada de conjugació Atg12-Atg5

La primera cascada de conjugació té lloc entre les proteïnes Atg12 i Atg5. Atg12 és una proteïna similar a la ubiquitina (UBL), de manera que pot ser conjugada mitjançant una reacció semblant al procés de ubiquitinització. En aquest cas, la conjugació és duta a terme per dues proteïnes Atg: Atg7 (enzim *E1-like*) i Atg10



(l'enzim E2-*like*). Atg12-Atg5 ja conjugades formen un complex amb la proteïna Atg16L1<sup>147,161</sup>.

### **2.2.3.2. La cascada de conjugació LC3**

LC3 és una proteïna UBL que forma part de la família Atg8-*like*. La família Atg8-*like* està formada per les proteïnes LC3 i les proteïnes associades al receptor gamma aminobutíric (GATE16/GABARAP). En aquesta segona cascada de conjugació, la proteïna LC3 és conjugada amb fosfatidiletanolamina (PE) passant de la seva forma sense conjuguar LC3-I, a la forma conjugada LC3-II. Per dur a terme aquesta reacció participen les proteïnes: Atg7 (enzim E1-*like*), Atg3 (enzim E2-*like*), i el complex Atg12-Atg5-Atg16L1 (amb activitat enzimàtica E3-*like*). Els altres membres de la família Atg8-*like* GATE16/GABARAP també poden ser conjugats i participen en estadis més avançats de la biogènesi dels autofagosomes com el tancament del fagòfor, la maduració dels autofagosomes i la fusió amb els lisosomes<sup>162</sup>.

Després d'elongar-se, el fagòfor es tanca formant la vesícula de doble membrana amb el contingut per degradar (autofagosoma). En aquest moment el complex Atg12-Atg5-Atg16L1 es desprèn, en canvi una part de la proteïna LC3-II romandrà a la membrana de l'autofagosoma mentre que la resta serà processada per la proteïna Atg4B tornant a la seva forma citosòlica (sense conjuguar) LC3-I<sup>163,164</sup>.

Com que la iniciació de l'autofàgia depèn de la formació del complex Atg12-Atg5-Atg16L1 i d'LC3-II, els models animals deficients en macroautofàgia sovint estan basats en la depleció genètica de les proteïnes Atg5 o Atg7, que resulta en la inhibició del procés ja que s'impedeix la formació del fagòfor<sup>144,165</sup>.

### **2.2.4. Maduració i fusió de l'autofagosoma**

La fusió de l'autofagosoma amb els lisosomes (autofagolisosomes) permet l'acidificació del medi gràcies a les bombes de protons dels lisosomes, i proporciona les hidrolases necessàries per la degradació del contingut. Per poder interaccionar amb els lisosomes i fusionar-se, els autofagosomes són desplaçats per la xarxa de microtúbuls gràcies a les dineïnes i les cinecines en el que s'anomena procés de maduració. Durant la maduració els autofagosomes es poden fusionar a endosomes tardans abans de formar l'autofagolisosoma. En aquest procés, intervien algunes proteïnes de les famílies Rab, proteïnes solubles d'unió al NFS (SNARE), o els complexos endosomal requerit per el transport (ESCRT)<sup>141,166</sup>. En el procés de maduració dels autofagosomes també hi participen les proteïnes GATE16/GABARAP, i el complex de nucleació PIK3C3 i el seu interactoma<sup>162,167</sup>.

Cal mencionar que alteracions en el contingut de lípids de la cèl·lula i per tant, la composició de les membranes, també afecten a la dinàmica de fusió i formació dels autofagolisosomes. Aquest aspecte podria ser especialment important en les alteracions de l'autofàgia relacionades amb malalties metabòliques<sup>168</sup>.

### **2.2.4. Anàlisi experimental de l'activitat autofàgica**

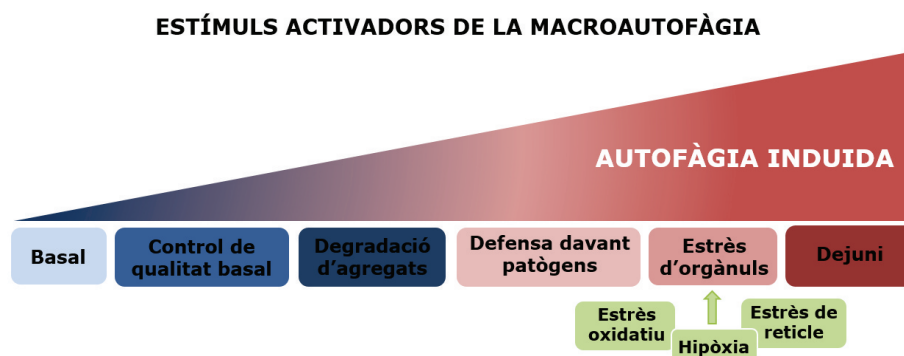
LC3 es fa servir sovint com a marcador de l'activitat autofàgica (o flux autofàgic) ja que és possible separar per electroforesi la forma conjugada LC3-II, i per tant associada a autofagosomes, de la forma sense conjuguar LC3-I. D'aquesta manera, la detecció de LC3-II és indicatiu de la presència d'autofagosomes a la cèl·lula.

Generalment es considera la detecció de nivells elevats de LC3-II en una cèl·lula o teixit com a indicatiu d'un elevat flux autofàgic. Cal tenir en compte però, que es pot donar la situació en que un bloqueig en estadis avançats del procés eviti que els autofagosomes siguin degradats, de manera que s'acumulen juntament amb LC3-II. Tot i ser menys freqüent, també es poden extreure conclusions errònies en el cas de detectar nivells baixos de LC3-II, degut al fet que l'autofàgia és un procés dinàmic: un flux autofàgic accelerat redueix el temps en el que és possible detectar la forma de LC3 associada a l'autofagosoma. Això, juntament amb el fet que una part de l'LC3-II es degrada en la fusió amb el lisosoma, pot provocar que s'infrarestimi l'activitat autofàgica. D'aquesta manera, per tal de discernir entre aquests possibles escenaris antagònics calen evidències experimentals complementaries.

Les anàlisis complementaries a la detecció de LC3-II estan sovint basades en la detecció de substrats comuns de degradació autofàgica, com la proteïna p62/SQSTM1. La tendència d'aquests substrats a acumular-se dins la cèl·lula pot servir d'indicatiu de baixos nivells d'activitat autofàgica i viceversa. També es poden utilitzar inhibidors de la fusió amb els lisosomes o de la pròpia activitat lisosomal (clororquina, leupeptina, bafilomicina) per tal de provocar un bloqueig controlat del flux autofàgic i comparar dues situacions: amb i sense inhibidors<sup>164</sup>. En aquest últim cas, la conseqüència del bloqueig de la degradació lisosomal hauria de ser l'acumulació d'autofagosomes que ja no poden ser degradats i, per tant, es pot comparar la quantitat de LC3-II que s'acumula respecte el basal com a indicatiu de flux autofàgic.

## 2.3. INDUCCIÓ DE L'AUTOFÀGIA

Les cèl·lules tenen uns nivells d'autofàgia basal com a mecanisme de control de qualitat (i quantitat) de proteïnes i orgànuls. L'autofàgia però, també forma part dels mecanismes que té una cèl·lula per adaptar-se a situacions d'estrès (Figura 7). Davant certs estímuls, els processos d'autofàgia s'activen de forma regulada i coordinada, juntament amb el sistema de degradació ubiquitina-proteasoma. De fet, si alguna de les vies de degradació esmentades falla, solen activar-se mecanismes compensatoris en les altres: si s'inhibeix o falla la macroautofàgia, pot induir-se la CMA de manera compensatòria i viceversa. Aquests mecanismes de compensació tot i que no supleixen del tot la falta d'una de les vies de degradació, contribueixen a mantenir la homeòstasi proteica (proteòstasi)<sup>169,170</sup>.



**Figura 7. Estímuls activadors de la macroautofàgia.** La cèl·lula pot induir l'autofàgia en major o menor mesura depenent de l'estímul estressor. Els nivells basals per al manteniment del recanvi proteic i d'orgànuls.

L'autofàgia té un rol dual en la supervivència cel·lular: s'indueix davant situacions d'estrès com a sistema de protecció, però quan el dany cel·lular supera cert llindar,

o si l'apoptosi es veu compromesa, l'autofàgia pot actuar com a mecanisme de mort cel·lular<sup>171</sup>. Tenint en compte que la inducció massiva de l'autofàgia pot desencadenar la mort cel·lular, existeixen estrictes mecanismes de regulació que permeten la inducció del procés quan cal, i que mantenen els nivells basals quan no.

Entre les diferents vies de senyalització que modulen l'autofàgia en mamífers, les més ben caracteritzades són les que responen als factors de creixement i a l'estat nutricional de la cèl·lula. La majoria d'aquestes vies de senyalització convergeixen en el complex 1 de la proteïna diana de la rapamicina de mamífers (mTORC1), el principal inhibidor autofàgic. Aquests sistemes de regulació han estat caracteritzats majoritàriament en cèl·lules hepàtiques.

### 2.3.1. Regulació dependent de mTORC1

La proteïna diana de la rapamicina de mamífers (mTOR) és una serina/treonina cinasa implicada en el control de diverses funcions cel·lulars com la síntesi proteica, el creixement i proliferació, la supervivència i l'autofàgia. mTOR és una dels principals sensors energètics i de senyalització de factors de creixement cel·lulars. Forma part del nucli de dos complexos proteics funcionalment diferents: mTORC1 i mTORC2. Aquests dos complexos tenen en comú el nucli format per les proteïnes mTOR, la proteïna d'interacció de mTOR amb dominis DEP (DEPTOR), el substrat de Akt ric en prolina de 40 kDa (PRAS40) i la proteïna letal en mamífers amb SEC13 8 (mLST8). El tret diferencial entre els dos complexos és la interacció amb la proteïna reguladora associada a mTOR (Raptor) en el cas del complex mTORC1, o amb l'acompanyant de mTOR insensible a la rapamicina (Rictor) en el cas del complex mTORC2. D'aquesta manera Raptor i Rictor confereixen l'especificitat de substrat i de regulació.

El complex mTORC1 és considerat un sensor energètic i d'estrès oxidatiu, ja que respon a l'estat nutricional i energètic de la cèl·lula regulant la síntesi proteica, el creixement cel·lular, el metabolisme energètic, i l'autofàgia. mTORC1 regula l'autofàgia a través de varis mecanismes:

- **Inhibició del complex ULK1:** mTORC1 interacciona directament amb el complex ULK fosforilant ULK1 i Atg13 i inhibint l'activitat del complex<sup>172</sup>. A més a més, mTORC1 pot modular l'activitat d'ULK1 inhibint AMBRA1<sup>173</sup>.
- **Inhibició de TFEB:** mTORC1 fosforila el factor de transcripció EF (TFEB), un dels principals factors de transcripció dels gens autofàgics i de biogènesi lisosomal<sup>174,175</sup>. La fosforilació de TFEB n'impedeix la translocació al nucli i per tant, inhibeix la l'autofàgia a nivell transcripcional<sup>176</sup>.
- **Activació de DAP1:** mTORC1 fosforila la proteïna associada a la mort 1 (DAP1), un inhibidor autofàgic. Quan mTORC1 està actiu, la fosforilació de DAP1 resulta en una reducció dels nivells d'autofàgia. Aquest sistema podria ser important a l'hora de mantenir els nivells d'autofàgia basal controlats<sup>177</sup>.

Quan la cèl·lula detecta que els aminoàcids són escassos, els nivells d'oxigen o d'ATP són baixos, o quan es redueix la senyalització de factors de creixement, la via mTORC1 s'inhibeix i s'activa l'autofàgia.

### **2.3.1.1. Factors de creixement i insulina**

La insulina i els factors de creixement IGF-1 inhibeixen l'autofàgia en favor de les vies de proliferació i síntesi proteica. Principalment regulen l'autofàgia a través de la via Akt-TSC-mTORC1<sup>178,179</sup>. Com veurem més endavant però, també poden inhibir l'autofàgia de manera independent a mTORC1.

### **2.3.1.2. Aminoàcids**

La cèl·lula necessita mantenir un reservori d'aminoàcids per sustentar la síntesi proteica i de nucleòtids, podent ser a més a més usats com a substrat energètic si cal. Com a mecanisme de reciclatge de proteïnes, l'autofàgia pot ser regulada per aquest reservori d'aminoàcids de tal manera que els sistemes de detecció d'aminoàcids cel·lulars promouen la translocació de mTORC1 a la superfície dels lisosomes possibilitant la interacció entre mTORC1 i el seu activador, la proteïna homòloga a Ras enriquida en cervell (Rheb)<sup>180</sup>. D'aquesta manera la presència d'aminoàcids manté l'autofàgia inhibida.

### **2.3.1.3. Estatus energètic cel·lular**

mTORC1 pot ser regulat per l'estatus energètic de la cèl·lula a través de la proteïna cinasa activada per AMP (AMPK), que actua com a sensor energètic cel·lular: quan els nivells d'ATP són baixos i la cèl·lula necessita substrats energètics, l'AMPK s'activa i indueix l'autofàgia. AMPK té accions antagòniques a mTORC1: activa TSC1/2 inhibint mTORC1, i fosforila ULK1 desplaçant mTORC1 de la unió mTORC1-ULK1 activant el complex de nucleació ULK<sup>181-183</sup>. L'activació d'AMPK pot donar-se en resposta a diversos estímuls d'estrès metabòlic com la falta de nutrients, l'estrès oxidatiu, la hipòxia, o l'estrès de RE<sup>184</sup>.

Existeixen altres sensors d'estrès cel·lular que poden activar l'autofàgia. p53 per exemple, activa l'autofàgia inhibint la via Akt-TSC1/2-mTORC1 a través de mecanismes transcripcionals. A més a més p53 també pot actuar inhibint l'autofàgia (especialment la degradació de mitocondries) quan es troba en el citosol, a través de la inhibició d'AMPK<sup>185-187</sup> i de la interacció amb la proteïna relacionada amb mitofàgia Parkin<sup>188-190</sup>. Aquest efecte és d'especial rellevància en el metabolisme del càncer.

## **2.3.2. Regulació independent de mTORC1**

Independentment de la via d'mTORC1, hi ha altres vies de senyalització que regulen els nivells d'autofàgia.

### **2.3.2.1. Calci**

Els nivells intracel·lulars de calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ) i d'inositol ( $\text{IP}_3$ ) poden regular l'autofàgia inhibint principalment la formació de l'autofagosoma, tot i que també poden actuar en estadis més avançats del procés<sup>191,192</sup>. Part d'aquests efectes es deuen a l'activació de la cisteïna proteasa dependent de  $\text{Ca}^{2+}$  calpaina que, quan s'activa, genera una retroalimentació positiva que manté l'autofàgia bloquejada. Això és degut a que la calpaina pot estimular la producció d'cAMP donant lloc a l'activació del receptor intracel·lular d'cAMP Epac. L'activació de Epac promou un increment de la síntesi d' $\text{IP}_3$  que estimula l'alliberament de calci del RE<sup>193</sup>.

Els nivells d'cAMP inhibeixen l'autofàgia a través del sistema Epac-IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup> de manera independent a la PKA. En certes circumstàncies però, l'cAMP pot actuar a través de a través de la via PKA i inhibir l'autofàgia<sup>194,195</sup>. Com a part dels treballs realitzats en aquesta tesi doctoral, en el nostre laboratori hem descrit els efectes de l'activació de via PKA a través de la senyalització noradrenèrgica/cAMP en adipòcits marrons.

### **2.3.2.2. Estrès de reticle**

L'acumulació de proteïnes mal plegades en el RE desencadena una situació d'estrès cel·lular que activa el sistema UPR (resposta proteïnes mal plegades). Una de les respostes UPR és l'activació de l'autofàgia (juntament amb la degradació proteasomal) per tal de degradar les proteïnes mal plegades i agregats citosòlics. Aquesta inducció de l'autofàgia per part de la UPR té lloc majoritàriament a través de l'activació d'AMPK i de l'activació de la transcripció de gens autofàgics<sup>195</sup>. Actualment, un tema en debat són els possibles efectes inhibitoris de l'estrès del RE sobre l'autofàgia a través dels efectes del calci descrits anteriorment.

### **2.3.2.3. Regulació a través de Beclin 1**

També hi ha varies cinases que poden modular l'autofàgia independentment d'mTORC1, l'acció de les quals generalment conflueix en Beclin 1 i en complex de nucleació PIK3C3. El dejuni i l'estrès del RE per exemple, poden induir l'autofàgia a través de la cinasa c-Jun N-terminal (JNK). Algunes proteïnes de la família BH3, com la proteïna de limfoma de cèl·lula B 2 (Bcl2) o Bim, regulen negativament la formació del complex ja que poden unir-se i segrestar Beclin 1, JNK promou l'alliberament de Beclin 1 possibilitant la formació del complex PIK3C3<sup>196</sup>.

La ruta de senyalització de la insulina i de IGF-1 pot inhibir l'autofàgia tant de manera dependent com independent d'mTORC1. Això és degut a diverses accions de Akt independents de mTORC1, com la fosforilació de Beclin 1 i dels factors de transcripció *forkhead box O* (FoxO)<sup>197,198</sup>.

### **2.3.3. Control transcripcional de l'autofàgia**

L'autofàgia ha estat considerada durant molt de temps un procés regulat principalment de manera post-transcripcional, a través d'interaccions proteïna-proteïna en el citosol i modificacions post-transcripcionals. Durant els últims anys però, ha emergit la importància dels mecanismes transcripcionals en la regulació del procés. Possiblement, les modificacions post-transcripcionals i les interaccions proteiques que tenen lloc en el citosol tenen uns efectes reguladors a curt termini, possibilitant una resposta ràpida. D'altra banda, els mecanismes transcripcionals dels gens autofàgics i de biogènesi lisosomal podrien estar modulant l'autofàgia a llarg termini.

S'han descrit varis factors de transcripció responsables del control del programa genètic i transcripcional de l'autofàgia i de la biogènesi lisosomal. Alguns d'ells responen preferentment a estímuls d'estrès: el factor induïble per hipòxia 1 (HIF-1), el factor de transcripció E2F1, p53, o ATF4; mentre d'altres estan implicats en la resposta a senyals metabòliques: TFEB, FoxO, CREB, PPAR $\alpha$ , FXR, C/EBP $\beta$ .<sup>199</sup>

TFEB és el principal factor de transcripció que regula la biogènesi lisosomal i varis gens autofàgics.<sup>174,175</sup> Quan la cèl·lula disposa de nutrients TFEB es troba a la



membrana lisosomal juntament amb mTORC1, que el fosforila mantenint-lo segrestat al citosol. Quan mTORC1 s'inactiva degut als senyals d'estrès metabòlic, TFEB s'allibera i es transloca al nucli, on pot iniciar el programa transcripcional autofàgic i de biogènesi lisosomal<sup>176</sup>. TFEB és capaç d'activar la seva pròpia transcripció a través d'una retroalimentació positiva<sup>200</sup> i, a més a més, indueix la transcripció de PGC1 $\alpha$  estimulant la incorporació dels àcids grassos lliures generats al lisosoma a la  $\beta$ -oxidació mitocondrial.

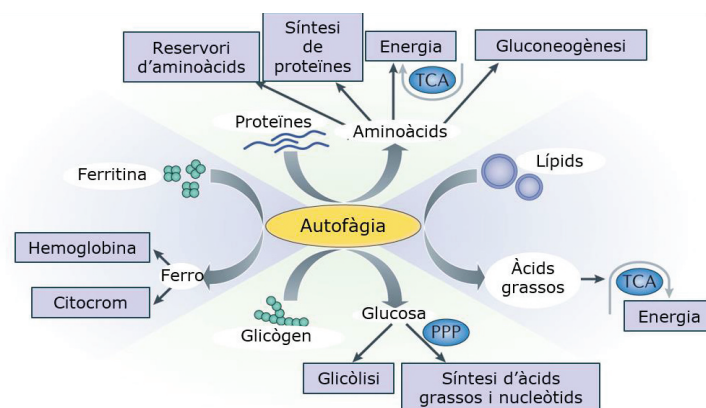
Recentment s'ha descrit com la interacció de FXR, CREB, PPAR $\alpha$  i TFEB coordinen la transcripció dels gens autofàgics en el fetge en resposta a l'estatus nutricional: PPAR $\alpha$ , CREB i TFEB inicien la transcripció del programa autofàgic en resposta al dejuni, mentre que FXR actua de repressor quan hi ha disponibilitat de nutrients<sup>201,202</sup>.

A més a més de TFEB, la família de factors de transcripció FoxO és una de les principals famílies de factors de transcripció implicades en la transcripció dels gens autofàgics. Els factors FoxO es troben *downstream* de la via Akt, responen a la senyalització d'IGF-1 i insulina. Són factors que activen la transcripció dels gens autofàgics quan es troben en el nucli. Akt fosforila FoxO i els reté al citosol, impedit-ne l'acció transcripcional. S'ha descrit com FoxO3 pot activar la transcripció dels gens autofàgics en el múscul en resposta al dejuni i a la denervació, i com FoxO1 controla la transcripció de varis gens autofàgics al fetge<sup>198,201,203</sup>.

C/EBP $\beta$  també està implicat en el control transcripcional dels gens autofàgics en el fetge, especialment durant els cicles ingesta-dejuni en resposta a mecanismes circadians. A més a més s'ha descrit com pot controlar la inducció de l'autofàgia durant la diferenciació cel·lular en cèl·lules adiposes<sup>204,205</sup>.

## 2.4. AUTOFÀGIA EN EL METABOLISME ENERGÈTIC

Com ja hem vist, l'estrès metabòlic és l'inductor autofàgic fisiològic més potent, sota el control dels sensors energètics cel·lulars mTORC1, AMPK, i d'hormones com la insulina i els factors de creixement. L'autofàgia es troba intrínsecament relacionada amb el metabolisme energètic, ja que els aminoàcids, àcids grassos lliures, sucres i altres macromolècules generats en la degradació poden ser usats com a substrats energètics, així com per generar noves proteïnes, glicans, oligonucleòtids o membranes. D'aquesta manera l'autofàgia juga un paper important en el catabolisme de proteïnes, la mobilització i emmagatzematge de lípids i l'homeòstasi de la glucosa (Figura 8)<sup>206,207</sup>.



**Figura 8. Degradació autofàgica de proteïnes, lípids, glicògen i ferritina.** Els substats autofàgics poden ser reciclats cap a vies anabòliques de síntesi de proteïnes, glucosa, àcids grassos i nucleòtids (PPP: cicle de les pentoses fosfat); o cap a vies catabòliques per obtenir energia com el cicle de Krebs (TCA) o la glicòlisi (Adaptat de Ref. 208).

#### **2.4.1. Autofàgia en el catabolisme de proteïnes**

L'autofàgia és important en el manteniment de la proteòstasi cel·lular. Més enllà de la importància de l'eliminació de proteïnes i agregats proteics potencialment tòxics, els aminoàcids que se'n deriven contribueixen al manteniment del reservori d'aminoàcids de la cèl·lula, necessari per a la síntesi de proteïnes i també de nucleòtids.

Els aminoàcids derivats de la degradació autofàgica poden ser desaminats per incorporar-se al cicle de Krebs i produir ATP (excepte la lisina i la leucina). Això és especialment important en el cas de situacions d'estrès energètic, durant les quals l'autofàgia s'activa per mantenir les necessitats energètiques i metabòliques de la cèl·lula<sup>208</sup>. Recíprocament, les vies de síntesi proteica poden obtenir aminoàcids a partir d'intermediaris del cicle de Krebs, com glutamat, glutamina, prolina i arginina a partir de l' $\alpha$ -cetoglutarat; o aspartat, asparagina, metionina, lisina i treonina a partir de l'oxalacetat. D'aquesta manera, el manteniment del reservori d'aminoàcids no només contribueix en l'aportació de substrats per al cicle de Krebs en situacions d'estrès, sinó que evita l'ús d'intermediaris del cicle per mantenir les vies anabòliques en condicions basals.

#### **2.4.2. Autofàgia en l'homeòstasi de la glucosa**

Els aminoàcids generats a través de la degradació autofàgica, també poden ser substrats gluconeogènics. En el fetge, els aminoàcids glicogènics generats gràcies a la degradació autofàgica de proteïnes poden ser transformats a glucosa i contribueixen a mantenir els nivells de glucosa en sang.<sup>209</sup>

Els dipòsits de glicogen també poden ser degradats per l'autofàgia gràcies a la presència de glucosidases lisosomals. Les molècules de glucosa resultants es poden incorporar a les vies catabòliques (glicòlisi) o poden ser derivades a les vies anabòliques per generar nucleòtids o àcids grassos. La degradació de glicogen per aquesta via és especialment rellevant en el múscul: l'acumulació de glicogen en el múscul és una de les característiques de les diverses malalties musculars relacionades amb defectes autofàgics esmentades anteriorment. En el fetge en canvi, tot i poder degradar el glicogen a través de l'autofàgia, aquest és degradat preferentment per l'enzim citosòlic glicogen fosforilasa, que genera molècules de glucosa que seran exportades per mantenir els nivells de glucosa en sang<sup>209,210</sup>.

Els nivells sanguinis de glucosa també es troben afectats per el correcte funcionament dels mecanismes autofàgics en el pàncrees. Estudis realitzats en ratolins deficients per autofàgia específicament en pàncrees, han descrit com l'autofàgia és necessària per la supervivència i proliferació de les cèl·lules  $\beta$  i, per tant, per la producció d'insulina<sup>211</sup>.

### 2.4.3. Autofàgia en el catabolisme de lípids

Les cèl·lules poden emmagatzemar lípids en forma de triglicèrids en LD citosòliques. Aquestes LD poden ser diana de la degradació autofàgica, en el que s'anomena lipofàgia. Les lipases àcides lisosomals degraden els triglicèrids generant àcids grassos lliures que poden ser incorporats al cicle de Krebs a través de la  $\beta$ -oxidació mitocondrial.

La lipofàgia va ser descrita primerament per Singh i col·laboradors en un article publicat a la revista *Nature* el 2009<sup>212</sup>. En aquest treball els autors van poder detectar vesícules de degradació autofàgiques amb lípids a l'interior en hepatòcits en cultiu i en fetges de ratolins dejunats, i van descriure com la inhibició de l'autofàgia (tant genètica, com farmacològica) redueix la hidròlisi de triglicèrids i promou l'acumulació de LD al citosol.

La mobilització dels dipòsits de lípids, doncs, es pot realitzar per lipòlisi convencional o per lipofàgia. La importància dels processos de la lipofàgia i de la lipòlisi segons el tipus cel·lular i el context metabòlic es discutirà més endavant.

## 2.5. IMPLICACIÓ DE L'AUTOFÀGIA EN MALALTIES HUMANES

La Dra. Beth Levine va demostrar per primera vegada la relació entre mutacions en gens de la maquinària autofàgica i càncer. Levine va descriure Beclin 1 com a proteïna supressora de tumors, descrivint posteriorment el rol antitumoral de l'autofàgia<sup>213</sup>. A partir d'aquest moment s'han pogut relacionar alteracions en l'autofàgia amb una gran varietat de malalties humanes: càncer, malalties neurodegeneratives, cardiovasculars, pulmonars, envelliment, i malalties metabòliques. A més a més, s'ha descrit com l'autofàgia participa en la defensa de la cèl·lula contra la invasió de microorganismes patògens intracel·lulars, virus, i en la resposta immunitària adaptativa, especialment durant la presentació antigènica<sup>214</sup>.

Les implicacions de l'autofàgia en malalties humanes han estat especialment descrites en el cas de les malalties neurodegeneratives, cardiovasculars i el càncer. Durant aquesta última dècada varis estudis en models animals i en humans han posat de rellevància el paper del processos autofàgics en el control del metabolisme i les malalties associades, com l'obesitat i el síndrome metabòlic.

### 2.5.1. Malalties neurodegeneratives

Una de les primeres evidències de la relació entre l'autofàgia i la funció neuronal va ser la descripció d'un fenotip neurodegeneratiu en ratolins genèticament deficientes per autofàgia en neurones<sup>215,216</sup>. Més endavant s'ha descrit com l'autofàgia és essencial en el manteniment axonal i n'evita la degeneració, essent els axons la zona més vulnerable de les neurones, possiblement degut a la seva dependència del tràfic vesicular<sup>217</sup>.

L'acumulació d'agregats proteics intracitoplasmàtics degut a la presència de proteïnes alterades, o l'acumulació de mitocondries disfuncionals i els efectes nocius que se'n deriven, són causes comuns en diverses malalties neurodegeneratives. Així doncs no és d'estranyar que alteracions en la funció autofàgica es trobin sovint associades a malalties neurodegeneratives com la malaltia de Huntington, l'Alzheimer o els diversos tipus de Parkinson, essent un factor que contribueix en el



desenvolupament i progressió d'aquestes malalties, alhora que una possible diana terapèutica<sup>218</sup>. Les principals relacions entre aquestes malalties i l'autofàgia es troben detallades a la Taula 2.

MALALTIA	CAUSES	GENS	PAPER DE L'AUTOFÀGIA	FACTORS AUTOFÀGICS
<b>Huntington</b>	Acumulació d'agregats proteics citoplasmàtics de huntingtina (HTT) amb regions ampliades de poliglutamina. Pèrdua de neurones en el neocòrtex i en el nucli estriat.	HTT	Les mutacions en la HTT impedeixen la interacció amb p62, l'autofàgia no s'indueix correctament i no degrada els agregats de HTT. Presència d'autofagosomes no funcionals.	Beclin 1 Rab5 Rhes Atg7
<b>Alzheimer</b>	Acumulació de plaques extracel·lulars del pèptid $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ) i acumulació de formes hiperfosforilades de la proteïna Tau formant cabdells neurofibril·lars en el citoplasma	PSEN1 PSEN2 APP	El A $\beta$ inhibeix la funció lisosomal impedit la seva degradació i la dels cabdells neurofibril·lars. L'acumulació d'autofagosomes incrementa la formació de A $\beta$ ja que contenen $\gamma$ -secretasa i enzims que poden processar la proteïna precursora amiloide (APP).	PS1 PS2 Beclin 1
<b>Parkinson autosòmic dominant</b>	Acumulació d'agregats d' $\alpha$ -sinucleïna formant els cossos de Lewy en neurones. Pèrdua progressiva de neurones dopaminèrgiques en la substantia nigra.	LRRK2 SNCA	Agregats proteics de la proteïna pre-sinàptica $\alpha$ -sinucleïna s'acumulen en el citoplasma inhibint les vies autofàgiques, alterant la seva pròpia degradació i promovent alteracions mitocondrials i estrès oxidatiu.	Rab1a Atg9A VPS35 Catepsina D LAMP2A Hsp70
<b>Parkinson autosòmic recessiu i esporàdic juvenil</b>	Pèrdua de substantia nigra (amb o sense cossos Lewy detectables).	PINK1 PARK2 DJ-1 ATP13A2	Les formes mutades de PINK1 i Parkin no induïen correctament la mitofàgia. Parkin podria estar implicada en la degradació autofàgica de la $\alpha$ -sinucleïna.	PINK1 Parkin ATP13A2

**Taula 2. Malalties neurodegeneratives relacionades amb alteracions en els processos autofàgics.** Atg: proteïna relacionada amb l'autofàgia; PS1: presenilina 1; PS2: presenilina 2; LRRK2: cinsasa amb repeticions riques en leucina 2; PINK1: cinsasa putativa induïda per PTEN 1; VPS35 : proteïna de classificació vesicular 35; LAMP2A: proteïna associada a lisosomes 2A ; Hsp70: proteïna de xoc tèrmic de 70 kDa.

## 2.5.2. Malalties cardiovasculars i miopaties

Alteracions en el control de l'autofàgia s'han associat a malalties cardiovasculars com cardiomiopaties, hipertròfia cardíaca, malaltia coronària, insuficiència cardíaca i dany per isquèmia-reperfusió. Un exemple n'és la malaltia de Danon on la deficiència genètica de la proteïna lisosomal LAMP2 causa una cardiomiopatia severa juvenil degut a un bloqueig de la degradació de les vesícules autofàgiques<sup>214</sup>.

En el cas de les cèl·lules cardíques i musculars és important el manteniment de la xarxa mitocondrial ja que són cèl·lules amb una alta taxa metabòlica. S'ha demostrat en models animals que un mal funcionament de la degradació mitocondrial afecta a la funció del cor i desencadena una insuficiència cardíaca.<sup>189</sup> En el cas del múscul esquelètic, la inhibició de l'autofàgia promou el desenvolupament de miopaties, com la miopatia centronuclear lligada al cromosoma X o la ja mencionada malaltia de Danon. Les cardiomiopaties degudes a disfuncions de l'autofàgia sovint estan classificades com a malalties lisosomals, juntament amb la malaltia de Pompe, caracteritzada per l'acumulació patològica de glicogen degut a la deficiència en l'enzim lisosomal  $\alpha$ -glucosidasa (maltasa àcida)<sup>219</sup>.

### 2.5.3. Càncer

Els fenòmens autofàgics tenen un paper dual i complex durant els diversos estadis de la progressió tumoral: transformació, creixement tumoral, invasió i metàstasi.

L'autofàgia té principalment un rol oncossupressor, determinat per el paper que juga en el manteniment de l'homeòstasi cel·lular i tissular a l'hora d'evitar la transformació tumoral. De fet, diverses proteïnes que inhibeixen l'autofàgia són potencialment oncogèniques (Akt, Bcl2); per contra, proteïnes capaces d'induir l'autofàgia poden prevenir la transformació tumoral (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat 3-fosfatasa PTEN, p53). Estudis realitzats en models animals han demostrat el paper supressor de tumors de varies proteïnes de la pròpia maquinària autofàgica, com per exemple Beclin1 o Parkin, una de les proteïnes relacionades amb la mitofàgia de la qual en parlarem extensament més endavant<sup>213,220</sup>.

Un cop desencadenat el procés carcinogènic però, l'autofàgia juga un paper important en el metabolisme de les cèl·lules cancerígenes. De fet l'autofàgia és necessària per l'òptima progressió tumoral, ja que protegeix els tumors de l'estrès metabòlic, la hipòxia, i l'acumulació de mitocondries disfuncionals<sup>221</sup>. Per exemple, en ratolins que expressen l'al·lel oncogènic de Kras en pàncrees i que són alhora autofàgic-deficients (Atg5<sup>-/-</sup> o Atg7<sup>-/-</sup>), s'ha vist que, tot i que aquest ratolins acumulen lesions pre-malignes en l'intraepiteli pancreàtic, la progressió tumoral d'aquestes lesions es troba bloquejada<sup>222</sup>. Això és degut a què la inhibició de l'autofàgia pot sensibilitzar els tumors a la falta de nutrients i pot restaurar la mort cel·lular en tumors resistents a apoptosi.

L'activació de l'autofàgia en cèl·lules tumorals també promou la secreció de factors pro-migratoris i invasius i incrementa la supervivència de les cèl·lules no adherides, evitant la mort per anoikis (apoptosi específica en cèl·lules no adherents)<sup>223,224</sup>.

L'autofàgia juga un paper important en el metabolisme dels tumors. Recentment s'ha descrit com les cèl·lules transformades són capaces d'obtenir nutrients del microambient tumoral, especialment aminoàcids de les proteïnes extracel·lulars<sup>225</sup>. Les cèl·lules tumorals són capaces d'activar l'autofàgia en les cèl·lules sanes del voltant i, a través d'aquest mecanisme de comunicació, obtenir aminoàcids (especialment alanina) que seran incorporats al cicle de Krebs per sustentar-ne el creixement<sup>226</sup>. Així doncs la inhibició de l'autofàgia no només en el tumor, sinó en el microambient que el rodeja, podria ser important per promoure la regressió tumoral.

## 2.6. IMPLICACIONS DE L'AUTOFÀGIA EN L'OBESITAT

Els processos autofàgics en el fetge, les neurones de l'hipotàlem i els teixits adiposos són d'especial rellevància en l'obesitat. Com veurem a continuació, la regulació de l'autofàgia en aquests teixits té conseqüències sistèmiques.

### 2.6.1. El fetge

Tant en l'obesitat com en el dejuni, el fetge ha de gestionar una gran quantitat de triglicèrids provinents de la dieta o de la lipòlisi induïda en el teixit adipós, respectivament. D'aquesta manera, l'autofàgia i, en concret, la lipofàgia, juguen un paper important a l'hora d'evitar l'acumulació de lípids en el fetge. En models de

ratolins on s'indueix obesitat genèticament (ratolins *ob/ob*) o a través d'una dieta rica en greixos (HFD) s'ha observat com l'autofàgia hepàtica està disminuïda, resultant en una acumulació patològica de triglicèrids i colesterol (fetge gras), inflamació, i en el desenvolupament de resistència a la insulina<sup>212,227,228</sup>. Actualment es creu que una alteració en el contingut lipídic de les membranes vesiculars podria ser un dels factors que estarien afectant negativament l'autofàgia hepàtica en l'obesitat<sup>168</sup>.

### 2.6.2. L'hipotàlem

La regulació central de la ingesta d'aliments té lloc en les neurones del nucli arquejat de l'hipotàlem. En el nucli arquejat hi ha dues poblacions de neurones responsables del control de la ingesta que duen a terme funcions oposades, les neurones secretores de la proteïna-r agouti (AgRP) i les neurones de propiomelanocortina (POMC). Les neurones AgRP tenen funcions orexigèniques gràcies a l'expressió d'AgRP i el neuropèptid Y; en canvi, les neurones POMC tenen funcions anorexigèniques gràcies a l'expressió de propiomelanocortina, que és processada fins a sintetitzar la hormona estimulant de melanòcits  $\alpha$  ( $\alpha$ -MHS). Els senyals orexigènics/anorexigènics són importants per la supervivència de l'organisme. Els senyals orexigènics, per exemple, serveixen per estimular els comportaments de cerca d'aliments. Alteracions en els sistemes que regulen aquests senyals però, poden desembocar en el que s'anomenen comportaments obesogènics.

L'autofàgia és un dels processos que regulen el funcionament de les neurones del nucli arquejat. Per una banda, les neurones AgRP utilitzen la lipofàgia per tal de generar àcids grassos lliures que estimulen la producció del neuropèptid AgRP, especialment en el dejuni<sup>229</sup>. D'altra banda, una reducció de l'autofàgia en les neurones POMC promou un fenotip de resistència a la leptina i disminueix la producció d' $\alpha$ -MHS, provocant comportaments d'hiperfàgia. Aquestes alteracions en el funcionament de les neurones POMC a més a més poden afectar negativament a la lipòlisi en el teixit adipós blanc, exacerbant el fenotip obès<sup>230</sup>.

Tot i que l'autofàgia sembla important en els dos tipus neuronals, si es bloqueja de manera general en el nucli arquejat resulta en un increment de la ingesta i el conseqüent guany de pes<sup>231</sup>. Així doncs, el manteniment de les funcions autofàgiques en el nucli arquejat de l'hipotàlem sembla ser important per tal de regular correctament la ingesta. De fet, tant l'obesitat com l'envelliment promouen una reducció de l'autofàgia a l'hipotàlem.

### 2.6.3. El teixit adipós

A diferència d'altres teixits, existeixen evidències científiques que posen de manifest una inducció en l'activitat autofàgica en el TAB en l'obesitat (tan en humans com en ratolins). En d'altres teixits com el fetge o el pàncrees en canvi, és la falta d'autofàgia el desencadenant dels efectes metabòlics adversos relacionats amb l'obesitat, com l'esteatosi hepàtica o la diabetis<sup>201,211,227,228</sup>.

Aquest increment de l'activitat autofàgica en el TAB en l'obesitat es va detectar a través d'estudis de biòpsies realitzades en pacients obesos, essent aquet fet més acusat en els dipòsits viscerals. S'ha detectat com l'expressió de varis marcadors autofàgics correlaciona positivament amb la distribució visceral del greix i amb nivells elevats d'hipertròfia dels adipòcits blancs<sup>232-234</sup>. A més a més, en estudis realitzats en

models animals, també s'ha observat una disminució de l'autofàgia en ratolins alimentats amb una dieta rica en greixos<sup>235,236</sup>. Tot i que aquest fet podria estar associat a un increment en els processos de diferenciació (per tal de dur a terme la hiperplàsia del teixit), també podria ser degut a processos inflamatoris. Com ja hem vist en capítols anteriors les citocines proinflamatòries produïdes en el TAB generen un estatus d'inflamació crònic que podria ser un dels factors desencadenants de la síndrome metabòlica. Primerament però, la funció dels macròfags és mantenir l'homeòstasi tissular i controlar els efectes nocius de l'elevada mortalitat cel·lular. Existeixen varies teories sobre la funció de l'autofàgia en aquest context. D'una banda, l'increment de l'autofàgia en els adipòcits podria estar desencadenant els processos inflamatoris a través de la inducció de l'apoptosi i la producció de citocines; per contra, podria tenir funcions protectores davant l'estrès metabòlic degut a les condicions d'hipòxia i d'estrès oxidatiu. De la mateixa manera es desconeix si l'increment de l'autofàgia en el teixit té lloc de manera secundària al desenvolupament de resistència a la insulina o per el contrari, forma part dels mecanismes que la causen<sup>233,234,237</sup>.

Recentment aquest model d'inducció de l'autofàgia en el TAB en l'obesitat però ha estat qüestionat. Els estudis anteriorment mencionats assumien que els adipòcits blancs eren els responsables de l'increment en l'autofàgia que es detectava en el teixit; un estudi dut a terme en el laboratori de la Dra. Isabelle Dugail ha posat en dubte aquest fet assenyalant els canvis en la composició cel·lular del TAB com a fet responsable de les diferències detectades<sup>238</sup>. Aquest estudi es basa en l'aïllament de la fracció d'adipòcits blancs del TAB subcutani de pacients sense sobrepès i pacients obesos abans i després de dur a terme un procediment de cirurgia bariàtrica. Els autors conclouen que aquesta fracció d'adipòcits madurs aïllada dels pacients obesos té l'activitat autofàgica reduïda i que la cirurgia bariàtrica contribueix al restabliment parcial de l'activitat.

Diversos estudis basats en la generació de línies cel·lulars deficientes en Atg5 o Atg7, i d'animals deficientes per Atg7 específicament en adipòcits, havien demostrat amb anterioritat el paper essencial de l'autofàgia durant l'adipogènesi. L'estudi de l'impacte de l'alteració de l'autofàgia en adipòcits en l'obesitat a través de l'ús d'aquests models animals planteja un problema a l'hora de diferenciar entre els efectes deguts a alteracions en l'adipogènesi, i els efectes que es deriven d'alteracions en la funció dels adipòcits madurs.

### **2.6.3.1. Autofàgia en el TAB**

Durant els primers estadis de l'adipogènesi té lloc una inducció de l'autofàgia, essent aquest un fenomen necessari per tal de que els adipòcits puguin assolir completament l'estatus d'adipòcit madur. En aquest sentit, s'ha descrit com la falta d'autofàgia en adipòcits blancs redueix l'expressió dels marcadors de diferenciació i incrementa la mortalitat cel·lular per apoptosi<sup>239-241</sup>. Tot i que el rol exacte de l'autofàgia durant l'adipogènesi és encara poc conegut, es coneix que durant els primers estadis de diferenciació els factors inhibidors de la diferenciació Klf2 i Klf3 són degradat mitjançant vies autofàgiques<sup>204</sup>. Un cop iniciada la diferenciació, els adipòcits blancs patiran un increment de la massa mitocondrial que, en estadis de diferenciació més avançats, es veurà reduïda. És possible que aquest fet es dugui a terme a través de mecanismes autofàgics<sup>242,243</sup>, tot i que es requereixen més estudis per tal de confirmar aquesta hipòtesi.

L'alteració en l'adipogènesi degut a la falta d'autofàgia també s'ha pogut observar *in vivo* utilitzant models de ratolí modificats genèticament de manera que perden la capacitat autofàgica en les cèl·lules adiposes (deleció de Atg7 sota el control del promotor FABP4/ap2). Una de les observacions més sorprenents d'aquests estudis va ser que la falta d'autofàgia en els teixits adiposos promou un increment en la massa de TAM i del *browning* en els dipòsits de TAB<sup>212,241</sup>. Cal mencionar que, per causes que es desconeixen, aquests ratolins presenten una elevada mortalitat espontània a partir de les 8 setmanes d'edat en comparació amb els ratolins de soca salvatge<sup>240</sup>.

#### **2.6.3.2. Autofàgia en el TAM**

A l'inici d'aquesta tesi no hi havia encara estudis realitzats sobre l'autofàgia en relació a la funció del teixit adipós marró. Tot i així, existien evidències de la importància de la degradació lisosomal en la biologia dels adipòcits marrons. Per una banda s'havia descrit com l'activació noradrenèrgica redueix la proteòlisi en general i l'activitat lisosomal en concret en adipòcits marrons<sup>244-246</sup>. Durant el transcurs de la present tesi han aparegut tres estudis que versen sobre diversos aspectes de l'autofàgia en la biologia del TAM i la funció termogènica; dos d'ells duts a terme en el laboratori del Dr. Rajat Singh i el tercer en el laboratori del Dr. Shingo Kajimura, els quals seran discutits més endavant.

### 3. MITOFÀGIA I PARKIN

---

Tot i que la macroautofàgia ha estat considerada durant molt de temps un sistema de degradació genèric, en els últims anys s'han anat descrivint diversos mecanismes per els quals els autofagosomes es formen específicament al voltant de determinades estructures, en el que s'anomena autofàgia selectiva.

Existeixen diferents tipus d'autofàgia selectiva determinats per el substrat de degradació com per exemple la mitofàgia (mitochondris) (mitofàgia), la pexofàgia (peroxisomes), la reticulofàgia (reticle endoplasmàtic), l'agrefàgia (agregats proteics), la glicogenofàgia (glicogen) o la lípofàgia (lípid)s<sup>247</sup>. El reconeixement de substrat en aquest tipus d'autofàgia té lloc gràcies a la interacció amb proteïnes que "senyalen" els diferents objectius de degradació: els receptors autofàgics.

#### 3.1. RECEPTORS AUTOFÀGICS

Per a què un determinat element sigui reconegut per ser degradat selectivament ha de (i) ser marcat com a diana de degradació i (ii) interaccionar amb les proteïnes que inicien la formació de l'autofagosoma. La ubiquitinització juga un paper clau en la senyalització de l'autofàgia selectiva ja que els substrats marcats per ser degradats es troben sovint ubiquitinitzats per tal de ser reconeguts per els receptors. La majoria de receptors contenen motius d'unió a ubiquitina (UBD) i motius d'interacció amb LC3 (LIR) (Figura 9).

S'han descrit diversos receptors capaços d'induir la degradació autofàgica d'agregats proteics, com p62/SQSTM1, la proteïna del gen veí a *BRCA1* 1 (NBR1), la optineurina (Opt) o la histona deacetilasa 6 (HDAC6). A més a més d'aquests agregats proteics, l'autofàgia selectiva juga un paper important en la degradació d'òrgans malmesos o que ja no son requerits per la cèl·lula, com és el cas de la mitofàgia i la degradació de mitocondris. Els principals receptors implicats en mitofàgia són: p62/SQSTM1, Opt, la proteïna d'interacció amb BCL2/adenovirus E1B de 19kDa (BNIP3), la proteïna X similar a NIP3 (NIX), i la proteïna amb domini FUND14 1 (FUNDC1)<sup>248</sup>.

#### 3.2. MITOFÀGIA

L'eliminació de mitocondris disfuncionals és important per l'homeòstasi i supervivència cel·lular ja que evita, entre d'altres efectes nocius, la sobreproducció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) o l'acumulació de mutacions en el DNA mitocondrial (mtDNA). En aquest sentit, defectes en el control de qualitat mitocondrial han estat relacionats amb diverses malalties humanes com el càncer o la neurodegeneració<sup>249,250</sup>.

La mitofàgia és, juntament amb els mecanismes de dinàmica mitocondrial, un dels principals processos implicats en el manteniment d'una adequada xarxa mitocondrial<sup>251-253</sup>. De fet els processos de fusió, fissió i transport de mitocondris poden estar regulats de manera coordinada amb la mitofàgia.

##### 3.2.1. Dinàmica mitocondrial i mitofàgia

Els mitocondris són òrgans dinàmics que es troben connectats gràcies a mecanismes de fissió i fusió formant el que s'anomena xarxa mitocondrial. La



regulació de la dinàmica mitocondrial és essencial a l'hora de distribuir els mitocondris durant la divisió cel·lular, o durant el creixement i diferenciació. A més a més confereix plasticitat a la cèl·lula per adaptar-se a canvis en el metabolisme energètic<sup>254-256</sup>.

En mamífers la fusió mitocondrial es troba mitjançada principalment per les mitofusines 1 i 2 (Mfn1/2) i la proteïna d'atròfia òptica 1 (OPA1), responsables de la fusió de la membrana mitocondrial externa i interna respectivament. D'altra banda la fissió mitocondrial es troba mitjançada principalment per la proteïna relacionada amb la dinamina (DRP1), que pot ser reclutada als mitocondris des del citosol per induir-ne la fissió, gràcies a la interacció amb proteïnes de la membrana mitocondrial<sup>254</sup>.

Els events de fusió-fissió permeten segregar els mitocondris disfuncionals dels que funcionen correctament i, d'aquesta manera, queden exposats a la degradació per mitofàgia. En aquest sentit s'ha descrit com la pèrdua de potencial de membrana redueix la capacitat de fusió dels mitocondris i d'aquesta manera la cèl·lula evita que mitocondris danyats es puguin reincorporar a la xarxa mitocondrial sana<sup>253</sup>. Mentre que la despolarització o l'estrès oxidatiu promouen la fissió i la mitofàgia, la fusió dels mitocondris pot actuar com a mecanisme protector davant la degradació autofàgica<sup>251,257</sup>.

A més a més dels processos de fusió i fissió, el moviment dels mitocondris per els citoesquelet també influeix en la distribució i el recanvi mitocondrial. Les mitofusines interactuen amb la Rho GTPasa mitocondrial Miro que alhora interactua amb les cinesines del citoesquelet. Problemes en la motilitat mitocondrial poden afectar a la degradació mitofàgica, especialment en neurones<sup>258</sup>.

Cal tenir en compte que la fragmentació mitocondrial no és suficient per induir la degradació dels mitocondris; com veurem a continuació existeixen mecanismes específics d'inducció de la mitofàgia que s'activen en condicions de dany mitocondrial. Aquests mecanismes sovint actuen recíprocament com a reguladors de la dinàmica mitocondrial. Un exemple d'això és el sistema PINK1-Parkin, principal mitjancer de la mitofàgia induïda per despolarització. Parkin pot ubiquitinitzar tant les mitofusines com Miro promovent-ne la degradació<sup>257-259</sup>.

### **3.2.2. PINK1 i Parkin**

La importància de les proteïnes PINK1 i Parkin en el control de qualitat mitocondrial va ser descrita gràcies a estudis genètics de pacients amb la malaltia de Parkinson. Aquests estudis van relacionar el desenvolupament de Parkinson autosòmic-recessiu i esporàdic juvenil amb mutacions en els gens de PINK1 i Parkin. Més endavant s'han realitzat estudis en models cel·lulars on, a través de l'expressió induïda de les formes mutades de PINK1 o de Parkin presents en la malaltia de Parkinson, s'ha pogut relacionar l'alteració en la funció d'aquestes proteïnes amb defectes en la mitofàgia<sup>260,261</sup>.

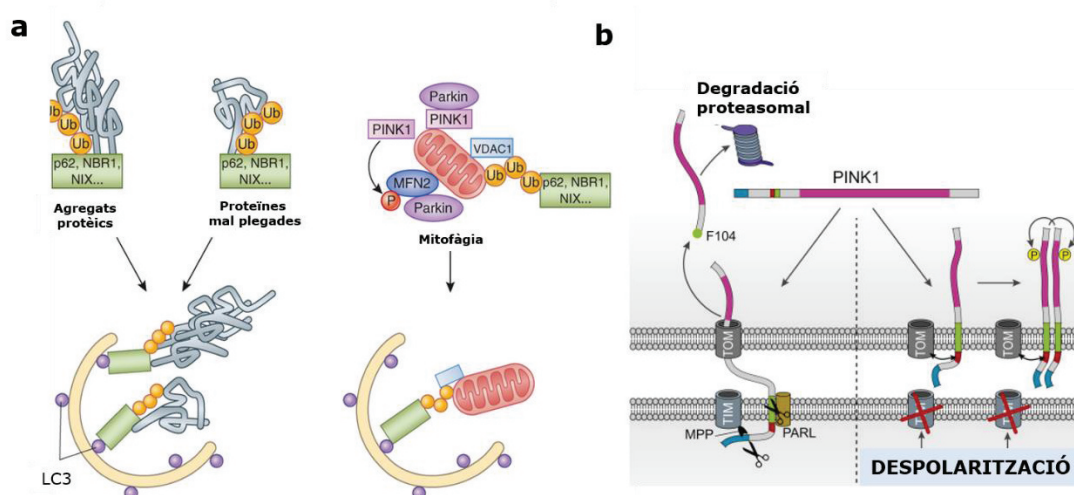
Un dels principals mecanismes per induir la mitofàgia és el reclutament de la proteïna Parkin des del citosol als mitocondris danyats<sup>262</sup>. Parkin és una proteïna ubiquitina lligasa de tipus E3 que es troba normalment en el citosol. En condicions de dany mitocondrial es transloca a la superfície mitocondrial on pot ubiquitinitzar diversos substrats de la membrana mitocondrial externa<sup>263</sup>. La presència d'aquestes proteïnes



ubiquitinitzades promou el reclutament de receptors autofàgics com p62/SQSTM i així s'indueix la degradació d'aquests mitocondris danyats. La translocació de Parkin als mitocondris és mitjançada per la cinasa putativa induïda per PTEN 1 (PINK1), que actua com a sensor de dany mitocondrial<sup>261</sup>.

En condicions normals els nivells de PINK1 són molt baixos. Això és degut a que, un cop sintetitzada, PINK1 és importada al mitocondri on és tallada per la proteïna associada a presinilina semblant a romboide (PARL) i degradada (Figura 9). El procés d'importació es troba regulat per les translocases de la membrana externa (TOM) i les translocases de la membrana interna (TIM). En condicions normals, mentre TOM i TIM transloquen PINK1, l'extrem N-terminal de la proteïna queda exposat a l'acció de PARL, que es troba a la membrana interna. Quan l'extrem N-terminal de PINK1 és tallat per PARL, l'extrem C-terminal és retornat al citosol i degradat per la via proteasomal<sup>264</sup>.

En canvi, en una situació de despolarització mitocondrial, el sistema de translocació i degradació s'inhibeix i PINK1 s'estabilitza a la superfície mitocondrial. En aquest context PINK1 pot fosforilar i reclutar Parkin<sup>260,261</sup>. Diversos estudis realitzats en *Drosophila* han descrit com el fenotip de falta de PINK1 pot ser revertit per la sobreexpressió de Parkin, però no a l'inrevés<sup>265,266</sup>. Tot i així, la fosforilació de Parkin sembla ser important per activar-ne l'activitat ubiquitina lligasa.



**Figura 9. Autofàgia selectiva de d'agregats protèics i mitocondris.** (a) Representació esquemàtica de la degradació autofàgica d'agregats i proteïnes mal plegades a l'esquerra, i mitofàgia a la dreta (Adaptat de Ref. 268). (b) Representació esquemàtica del mecanisme de regulació de l'activitat de PINK1 per degradació-estabilització a la membrana mitocondrial (Adaptat de Ref. 269).

Un cop Parkin és reclutada als mitocondris ubiquitinitza varies proteïnes mitocondrials com Mfn1/2, TOMM20, el canal aniónic dependent de voltatge (VDAC), o Miro, per tal d'iniciar la mitofàgia. Algunes d'aquestes ubiquitinitzacions marquen aquestes proteïnes per ser degradades a través del proteasoma, com en el cas de les mitofusines, mentre que d'altres serveixen com a senyal per tal de reclutar els receptors autofàgics, com en el cas de la ubiquitinització de VDAC<sup>267,268</sup>. El reclutament dels receptors autofàgics (com p62/SQSTM) promou la interacció amb la maquinària autofàgica i d'aquesta manera s'inicia la construcció del fagòfor al voltant del mitocondri<sup>145</sup>. S'han descrit diverses deubiquitinases que poden

antagonitzar Parkin, com les proteases específiques per ubiquitina USP30 o USP35<sup>269,270</sup>.

A més amés de la degradació de mitocondris sencers, s'ha descrit que PINK1 i Parkin poden promoure la degradació de material mitocondrial a través de la generació de petites vesícules que es fusionaran amb els lisosomes, anomenades vesícules derivades de mitocondris (MDV)<sup>271,272</sup>. Les MDV generalment es formen en condicions d'estrès oxidatiu podent contenir proteïnes oxidades per tal de ser degradades, però també podria ser un mecanisme de degradació selectiva de proteïnes mitocondrials en condicions normals. Un estudi realitzat en *Drosophila* ha descrit com la falta de PINK1 o de Parkin afecta al recanvi de les proteïnes mitocondrials de manera diferencial, de manera que el recanvi de les subunitats de la cadena respiratòria es veu més afectat que la resta<sup>273</sup>. La degradació de les subunitats del sistema OXPHOS per la via MDV podria ser una explicació a aquest fet.

S'han descrit mecanismes inductors de la mitofàgia en el quals els receptors autofàgics BNIP3 i NIX són reclutats a la superfície mitocondrial de manera independent de Parkin. Aquest fenomen s'ha observat en cèl·lules sotmeses a estímuls d'estrès oxidatiu, hipòxia, i en la degradació de mitocondris que té lloc durant la maduració dels eritròcits<sup>269</sup>.

Cal dir però que la majoria d'estudis realitzats sobre el sistema PINK1-Parkin en mitofàgia s'han realitzat en sistemes cel·lulars *in vitro*. Sovint s'estudia la mitofàgia induïda per PINK1 i Parkin mitjançant la sobreexpressió d'aquestes proteïnes (generalment unides a proteïnes fluorescents) en línies cel·lulars immortalsitzades i utilitzant agents químics despolaritzants. Són necessaris doncs estudis sobre el sistema PINK1-Parkin i la mitofàgia en un context fisiològic. Com veurem més endavant, en aquesta tesi doctoral s'estudia la importància de la mitofàgia i de Parkin en la biologia del teixit adipós marró, on la despolarització mitocondrial té lloc de manera fisiològica per tal de dur a terme la funció termogènica.

## **3.2. FUNCIONS DE PARKIN EN EL METABOLISME CEL·LULAR**

Més enllà de les funcions relacionades amb la degradació de proteïnes mitocondrials, s'han descrit altres funcions de Parkin relacionades amb el control del cicle cel·lular, la biogènesi mitocondrial o el metabolisme energètic<sup>274</sup>. Per exemple, l'activitat ubiquitina de Parkin pot promoure la degradació d'un inhibidor transcripcional de PGC1 $\alpha$ , el substrat d'interacció amb Parkin (PARIS), i d'aquesta manera induir la biogènesi mitocondrial<sup>275</sup>. De fet estudis *in vitro* ja havien relacionat amb anterioritat l'activitat de Parkin amb la biogènesi mitocondrial, en aquest cas a través de la interacció amb TFAM<sup>276</sup>.

### **3.2.1. Parkin i el metabolisme de la glucosa**

Parkin pot regular enzims del metabolisme de la glucosa a través de l'activitat ubiquitina-lligasa. Com veurem a continuació, Parkin pot dur a terme funcions protectores davant l'efecte Warburg, actuant d'aquesta manera com a proteïna supressora de tumors<sup>220</sup>.

Les cèl·lules cancerígenes pateixen una reprogramació del metabolisme energètic (essencial per la progressió tumoral) que s'anomena efecte Warburg. En condicions aeròbiques, la cèl·lula transforma el piruvat en acetil-CoA gràcies a l'enzim piruvat

deshidrogenasa (PDH) i aquest entra al cicle de Krebs per generat ATP a través de la fosforilació oxidativa. En canvi, en condicions de baixa disponibilitat d'oxigen, la cèl·lula deriva el piruvat provinent de la glicòlisi a la formació de lactat (fermentació làctica). L'efecte Warburg, també anomenat glicòlisi aeròbica, consisteix en un canvi en el metabolisme de la glucosa pel qual les cèl·lules utilitzen la glicòlisi com a via majoritària d'obtenció de ATP. Com que la glicòlisi aeròbica produeix ATP de forma molt poc eficient en comparació amb la fosforilació oxidativa, les cèl·lules tumorals compensen aquest fet incrementant la captació de glucosa. Part de la glucosa captada, serà derivada a la formació de piruvat i lactat, mentre que la major part serà destinada a les vies anabòliques (síntesi de nucleòtids i macromolècules) per tal de sustentar el creixement tumoral.

Diversos estudis han demostrat com la deficiència en Parkin pot provocar un increment en la glicòlisi i la producció de lactat, promovent un increment en la captació glucosa i reduint el consum d'oxigen en alguns tipus cel·lulars<sup>277,278</sup>. Part d'aquests efectes es deuen a la reducció en l'expressió i en l'activitat de l'enzim PDH, de manera que el flux d'acetil-CoA que s'incorpora al cicle de Krebs es veu alterat.

Recentment s'ha descrit com Parkin també pot regular la glicòlisi mitjançant el control de la producció de piruvat. Parkin ubiquitinitza l'enzim piruvat cinasa 1/2 (PKM1/2), que catalitza la transformació de fosfoenolpiruvat a piruvat, essent aquest l'últim pas de la glicòlisi i un dels factors limitants del procés. La ubiquitinització de PKM1/2 redueix l'activitat de l'enzim disminuint el flux glicolític general<sup>279</sup>.

A més a més de la regulació del metabolisme de la glucosa a nivell cel·lular, s'ha descrit com la falta de Parkin pot afectar als nivells de glucosa sistèmics ja que sembla ser important per la correcta producció d'insulina per part de les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques<sup>280</sup>.

### **3.2.2. Parkin i el metabolisme de lípids**

Parkin ha emergit recentment com un nou regulador del metabolisme dels lípids gràcies a la interacció amb el transportador de lípids CD36. En un estudi realitzat principalment en fetge, Kim i col·laboradors van descriure com Parkin pot promoure l'estabilització de CD36 i d'aquesta manera incrementar-ne l'expressió, essent aquest fet d'especial rellevància en la obesitat<sup>281</sup>. Mentre que durant l'obesitat induïda per HFD Parkin es troba sobreexpressada en fetge, els ratolins deficients per Parkin són resistent al guany de pes i mantenen la sensibilitat a la insulina en el fetge. A més a més d'aquests efectes sobre l'expressió de CD36, un treball publicat recentment suggereix que els ratolins deficients per Parkin podrien tenir problemes en l'absorció intestinal dels lípids<sup>282</sup>.

A l'inici de la present tesi el paper de Parkin en la biologia del teixit adipós era poc conegut.



**OBJECTIUS**

---



## OBJECTIUS

---

La identificació dels mecanismes reguladors que controlen l'activitat termogènica del teixit adipós marró pot proporcionar potencials dianes terapèutiques per l'obesitat i les malalties metabòliques que se'n deriven.

L'objectiu global que es va establir per a la present tesi doctoral fou determinar el paper de l'autofàgia en l'activitat termogènica en el teixit adipós marró. Els objectius concrets es troben detallats a continuació:

1. Estudiar els efectes de l'activació termogènica en l'activitat autofàgica i determinar els mecanismes moleculars implicats en la seva regulació.
2. Caracteritzar el paper de Parkin i la mitofàgia en l'activitat del teixit adipós marró i determinar els mecanismes moleculars implicats en la seva regulació.
3. Caracteritzar metabòlicament ratolins modificats genèticament per la supressió de l'expressió de Parkin, i determinar els efectes de la falta de Parkin sobre l'activitat del teixit adipós marró.





# **INFORME DELS CODIRECTORS DE TESI**

---



# INFORME DELS CODIRECTORS DE TESI

---

## Informe dels codirectors en relació a la tesi doctoral de Montserrat Cairó Calzada (publicacions i paper de la doctoranda)

En tant que codirectors de la Tesi Doctoral de Montserrat Cairó Calzada, fem constar que els treballs corresponents a la memòria científica s'estructuren en base als següents articles científics.

### 1. Cairó M, Villarroya J, Cereijo R, Campderrós L, Giralt M, Villarroya F.

*Thermogenic activation represses autophagy in brown adipose tissue*

Int J Obes (Lond). 2016 Oct;40(10):1591-1599

IF: 5,34. 18 de 133 ENDOCRINOLOGY & METABOLISM (1er Quartil); 6 de 80 NUTRITION & DIETETICS (1er Decil)

### 2. Cairó M, Villarroya J, Campderrós L, Gavalda-Navarro A, Cereijo R, Quesada-López T, Marta Giralt M, Villarroya F.

*Parkin, a novel actor in the control of brown adipose tissue activity*

Enviat a Molecular Metabolism

IF:5,36. 17 de 133 ENDOCRINOLOGY & METABOLISM (1er Quartil).

La doctoranda, primera autora de les dues publicacions anteriors, ha tingut tot el protagonisme en l'obtenció experimental de les dades així com en l'evolució i progressió dels estudis, i ha participat de manera essencial en la discussió científica dels resultats. El paper dels altres coautors ha estat el donar suport a aspectes experimentals (suport a obtenció de mostres i alguns aspectes analítics específics) així com la participació dels codirectors i altres autors sènior que han participat en aspectes intel·lectuals, d'elaboració i contextualització de les dades.

### 3. Giralt M, Cairó M, Villarroya F.

*Hormonal and nutritional signalling in the control of brown and beige adipose tissue activation and recruitment*

Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2016 Aug;30(4):515-525

IF: 5,07. 21 de 133 ENDOCRINOLOGY & METABOLISM (1er Quartil)

Cal esmentar que la temàtica de la Tesi requeria una important tasca d'actualització sistematitzada dels coneixements de regulació del teixit adipós marró. Això es plasma en la publicació de la revisió anterior, en que M. Cairó ha contribuït de forma essencial, realitzant cerques exhaustives de la bibliografia, integrant la informació i participant en la interpretació de la informació obtinguda. Com a tasca important per al contextualització de la seva Tesi, M. Cairó figura com a coautora d'aquesta publicació juntament amb dos investigadors sènior.

Juntament amb els articles anteriors, que formen el nucli temàtic essencial de la Tesi, durant el període de desenvolupament del seu doctorat M. Cairó ha desenvolupat treballs associats a la seva Tesi que han resultat en dues publicacions.

Fonamentalment M. Cairó ha desenvolupat les tècniques de cultius primaris d'adipòcits beix i la seva diferenciació, així com altres procediments analítics que han estat bàsics per a les següents publicacions en què consta com a co-autora. La temàtica està estretament relacionada amb els estudis de regulació del teixit adipós marró i beix, per la qual cosa M. Cairó ha contribuït en ells també des del punt de vista d'anàlisi i interpretació global de les dades.

**4.** Quesada-López T, Cereijo R, Turatsinze JV, Planavila A, **Cairó M**, Gavalda-Navarro A, Peyrou M, Moure R, Iglesias R, Giralt M, Eizirik DL, Villarroya F.

*The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes*

Nat Commun. 2016 Nov 17;7:13479

IF: 11,33. 3 de 63 MULTIDISCIPLINARY SCIENCES (1er Decil)

**5.** Gavalda-Navarro A, Moreno-Navarrete JM, Quesada-López T, **Cairó M**, Giralt M, Fernández-Real JM, Villarroya F.

*Lipopolysaccharide-binding protein is a negative regulator of adipose tissue browning in mice and humans*

Diabetologia. 2016 Oct;59(10):2208-18

IF: 6,20. 12 DE 133 ENDOCRINOLOGY & METABOLISM (1er Decil)

A Barcelona, el.....de .....de 2017

Signat:

Francesc Villarroya i Gombau  
Director

Joan Villarroya i Terrade  
Director

## **PUBLICACIONES**

---





## **Thermogenic activation represses autophagy in brown adipose tissue**

**Revista:** International Journal of Obesity

**PMID:** 27339605

**Títol:** L'activació termogènica reprimeix l'autofàgia en el teixit adipós marró

### **Resum:**

**ANTECEDENTS:** La termogènesi del teixit adipós marró (TAM) és un procés adaptatiu, essencial per la despesa energètica de l'organisme, i implicat en el control de l'obesitat. L'obesitat es troba associada amb un increment anormal de l'autofàgia en el teixit adipós blanc. S'ha proposat que l'autofàgia podria tenir un paper rellevant per la determinació adipocitària (blanc vs marró) durant la diferenciació; emperò, el rol de l'autofàgia en la resposta del TAM a l'activació termogènica es desconeix.

**METODOLOGIA:** Es va analitzar in vivo els efectes de l'activació termogènica en l'autofàgia en el TAM usant ratolins exposats a condicions de fred durant 24h. Els efectes de la noradrenalina (NE), de l'cAMP i de moduladors de l'activitat lisosomal van ser determinats en cultius primaris d'adipòcits marrons diferenciats. Es va quantificar l'expressió dels transcrits a través de PCR a temps real, i es va determinar l'expressió de proteïnes a través d'immunotransferència. Les anàlisis realitzades usant el microscopi electrònic de transferència i les realitzades usant el microscopi confocal, prèvia incubació amb anticossos específics o reactius amb emissió de fluorescència, es van dur a terme en TAM i en adipòcits marrons en cultiu respectivament.

**RESULTATS:** L'autofàgia és reprimida en associació amb l'activació de la termogènesi induïda per fred en el TAM de ratolins. Aquest efecte és reproduïble en adipòcits marrons per l'acció de la NE, la qual actua mitjançant l'cAMP, principalment a través de la via de la proteïna cinasa A. La inhibició de l'autofàgia en adipòcits marrons promou un increment en els nivells d'expressió de la proteïna UCP1, i un increment en la respiració desacoblada, la qual cosa suggereix que l'autofàgia té un paper repressor sobre l'activitat de la maquinària termogènica en el TAM. En condicions basals, els adipòcits marrons mostren signes d'activitat lipofàgica, la qual es veu suprimida per l'estímul termogènic mitjançant per cAMP.

**CONCLUSIONS:** Aquests resultat mostren la relació inversa que s'estableix entre l'autofàgia i l'activitat termogènica induïda per NE en el TAM, apuntant cap a la repressió de l'autofàgia com un dels mecanismes adaptatius dels adipòcits marrons per tal d'activar la termogènesi.



## ORIGINAL ARTICLE

# Thermogenic activation represses autophagy in brown adipose tissue

M Cairó<sup>1</sup>, J Villarroya<sup>1,2</sup>, R Cereijo<sup>1</sup>, L Campderrós<sup>1</sup>, M Giral<sup>1</sup> and F Villarroya<sup>1</sup>

**BACKGROUND:** Brown adipose tissue (BAT) thermogenesis is an adaptive process, essential for energy expenditure and involved in the control of obesity. Obesity is associated with abnormally increased autophagy in white adipose tissue. Autophagy has been proposed as relevant for brown-vs-white adipocyte differentiation; however, its role in the response of BAT to thermogenic activation is unknown.

**METHODS:** The effects of thermogenic activation on autophagy in BAT were analyzed *in vivo* by exposing mice to 24 h cold condition. The effects of norepinephrine (NE), cAMP and modulators of lysosomal activity were determined in differentiated brown adipocytes in the primary culture. Transcript expression was quantified by real-time PCR, and specific proteins were determined by immunoblot. Transmission electron microscopy, as well as confocal microscopy analysis after incubation with specific antibodies or reagents coupled to fluorescent emission, were performed in BAT and cultured brown adipocytes, respectively.

**RESULTS:** Autophagy is repressed in association with cold-induced thermogenic activation of BAT in mice. This effect was mimicked by NE action in brown adipocytes, acting mainly through a cAMP-dependent protein kinase A pathway. Inhibition of autophagy in brown adipocytes leads to an increase in UCP1 protein and uncoupled respiration, suggesting a repressing role for autophagy in relation to the activity of BAT thermogenic machinery. Under basal conditions, brown adipocytes show signs of active lipophagy, which is suppressed by a cAMP-mediated thermogenic stimulus.

**CONCLUSIONS:** Our results show a noradrenergic-mediated inverse relationship between autophagy and thermogenic activity in BAT and point toward autophagy repression as a component of brown adipocyte adaptive mechanisms to activate thermogenesis.

*International Journal of Obesity* (2016) 40, 1591–1599; doi:10.1038/ijo.2016.115

## INTRODUCTION

Brown adipose tissue (BAT) is the main site of non-shivering thermogenesis in mammals. BAT activity in rodent models not only ensures appropriate adaptation to cold environment but also protects against obesity by promoting energy expenditure.<sup>1,2</sup> Recent studies have indicated that adult humans possess active BAT, contrary to the prevailing concept that the role of BAT in humans is restricted to neonates, and further showed that BAT activity is systematically reduced in obese patients.<sup>3–5</sup>

Brown adipocytes possess large amounts of mitochondria with a high oxidative capacity. Mitochondrial uncoupling protein-1 (UCP1), uniquely expressed in brown adipocytes, uncouples the respiratory chain from oxidative phosphorylation, thus leading to high oxidation rates and the use of metabolic energy to provide heat. Lipid stores in brown adipocytes, used for fueling mitochondrial oxidation, are stored as multilocular droplets that are in close proximity to mitochondria. To sustain the metabolic energy needs of heat production, brown adipocytes also possess strong enzymatic machinery for glucose and lipid uptake and oxidation.<sup>6</sup>

BAT is an extremely plastic tissue, in keeping with its need to adapt to changing thermal and dietary conditions. When thermogenesis is activated, existing brown adipocytes adapt by enhancing the amount of intracellular protein devoted to oxidative pathways, including UCP1 synthesis and mitochondrial biogenesis. Overall, sympathetic activation and noradrenergic

stimuli appear to be the main mechanism involved in orchestrating BAT activation processes, although a growing number of non-adrenergic neuro-endocrine factors<sup>7</sup> and regulatory molecules such as adenosine<sup>8</sup> have also been identified.

Autophagy is a process that contributes to the maintenance of cellular homeostasis by removing damaged organelles and recycling intracellular substrates.<sup>9</sup> Autophagy has an important role in cellular adaptive changes to physiological and pathological challenges, for example, providing substrates during nutrient deprivation, and degrading intracellular ectopic lipid accumulation; it also is involved in differentiation-associated remodeling events.<sup>9–12</sup> Macroautophagy (referred to hereafter as autophagy) involves the formation of double-membrane vesicles (autophagosomes) that engulf a portion of the cytosol and deliver the incorporated cargo to the lysosome for degradation.<sup>13</sup>

There is a close relationship between autophagic activity and energy metabolism.<sup>14–16</sup> Complex intracellular pathways regulate autophagic activity by controlling different protein interactions, similar to those involving autophagy-related (Atg) protein conjugation cascades, as well as posttranslational protein modifications involved in autophagosome formation and substrate recognition. Recent data indicate that transcriptional regulation of genes encoding autophagy components also has a role in the regulation of autophagy by metabolic and endocrine signals.<sup>17</sup> On the other hand, multiple studies are coincident in reporting that human obesity is associated with increased autophagy in white adipose tissue.<sup>14,18,19</sup>

<sup>1</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB) and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Barcelona, Spain and <sup>2</sup>Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. Correspondence: Professor F Villarroya, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 643, Barcelona 08028, Spain.

E-mail: fvillarroya@ub.edu

Received 2 February 2016; revised 1 June 2016; accepted 12 June 2016; accepted article preview online 24 June 2016; advance online publication, 19 July 2016

Some reports have indicated that autophagy may have a role in regulating brown adipocyte differentiation. Impairment of autophagy through suppression of *Atg7* in *aP2+* adipocytes has been reported to cause acquisition of a BAT phenotype by white adipose tissue (browning) as well as increase BAT mass.<sup>20,21</sup> In addition, a more recent study has shown that suppression of *Atg7* specifically in *Myf5+* precursor cells disrupts brown adipocyte differentiation and function,<sup>22</sup> suggesting that autophagy is necessary during brown adipocyte differentiation. However, the role of autophagy in the adaptation of BAT to thermogenic activation has not been determined. Here we report that thermogenic activation leads to strong repression of autophagic activity in BAT, via the noradrenergic, cAMP-mediated pathway of BAT regulation.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Adult (5-month-old) male C57BL/6J Ola Hsd and Swiss ICR (CD-1) mice were obtained from Harlan Laboratories (Barcelona, Spain) and were maintained under a 12 h dark/light cycle with *ad libitum* access to food (2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet; Harlan Laboratories) and water. All experiments were performed in accordance with the European Community Council directive 86/609/EEC, and experiments as well as the number of animals to be used were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona based on the expected effects size. C57BL/6J mice were randomly divided into two groups. One group (controls;  $n=8$ ) was maintained at the standard animal facility temperature (22 °C) and the other group was exposed to cold (24 h at 4 °C;  $n=7$ ). For fasting experiments, animals were randomly divided into fasted (24 h,  $n=6$ ) and fed *ad libitum* ( $n=6$ ) groups, and then killed by decapitation. Interscapular BAT pads were dissected, after which one piece was frozen in liquid nitrogen for mRNA and total protein extraction and another piece was fixed for electron microscopy (see below).

### Cell culture and reagents

Primary cultures of brown adipocytes were obtained by first isolating preadipocytes from interscapular, cervical and axillary BAT depots from 3-week-old Swiss ICR (CD-1) or C57BL/6J mice. Isolated precursor cells were then plated and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 Medium (1:1) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% Fungizone, 20 nM insulin, 2 nM T3 and 100 µM ascorbate. Experiments were performed on day 10 of culture, at which point 90% of cells were considered to be differentiated on the basis of lipid accumulation and brown adipocyte morphology. Three independent cell culture experiments were analyzed and assays were carried out in triplicate for every experimental condition at every cell culture set. Where indicated, cells were treated with 0.5 µM norepinephrine (NE), 1 mM dibutyryl cAMP, 100 µM leupeptin (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 20 mM ammonium chloride, 10 mM 3-methyladenine, 10 µM H89 and/or 10 µM SB202190. Immortalized brown adipocytes from C57BL/6J mice, a gift from J Klein (Medical University of Lübeck, Lübeck, Germany), were cultured as previously described.<sup>23</sup> For immunofluorescence assays, cells were cultured on poly-L-lysine-coated coverslip in 24-well plates at  $3 \times 10^4$  cells per well. All reagents used for cell culture and cell treatments were from Life Technologies (Eugene, OR, USA) or Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) unless otherwise stated.

### Fluorescence microscopy

Adherent cells on coverslips were incubated when indicated with MitoTracker Orange CM-H<sub>2</sub>TMRos (Invitrogen, Eugene, OR, USA) or BODIPY 558/568 C12 (Life Technologies) rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. After fixation, cells were permeabilized with Triton X-100 in PBS and blocked by incubating with blocking buffer consisting of PBS containing 2% bovine serum albumin and 0.3% Triton X-100. Cells were incubated overnight at 4 °C with an anti-LC3B primary antibody (no. 2775S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and then rinsed and incubated for 2 h at room temperature with the Alexa-488-conjugated secondary antibody (A11070, Life Technologies). Cells were co-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (Life Technologies) and mounted with Mowiol (EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA). Images were acquired on a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica

Microsystems, Wetzlar, Germany) using a  $\times 63/1.32$  oil-immersion objective. Confocal z-stacks (5-µm-thick sections) were acquired at equivalent exposure times, and images were analyzed using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). Cellular fluorescence, expressed as the corrected integrated density per cell, was quantified in maximum-intensity projections. Cells from three independent cell cultures were analyzed, and >25 cells from three replicates per condition were analyzed. Colocalized pixels were detected and depicted in white using the 'colocalization finder' plugin in ImageJ. Images were processed using Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, San José, CA, USA) for brightness and contrast adjustments; the same changes were applied to all compared images.

### Electron microscopy

BAT samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and postfixed in 1% osmium tetroxide and 0.8% FeCNK in phosphate buffer. After dehydration in a graded acetone series, tissue samples were embedded in Spurr resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Jeol 1010 transmission electron microscope (Izasa Scientific, Barcelona, Spain).

### RNA isolation and real-time quantitative PCR

RNA from tissues and cells was extracted using a NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and the levels of mRNA were determined by quantitative reverse transcription-PCR, using the corresponding TaqMan probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Supplementary Table S1). The mRNA level of each gene of interest was normalized to that of a housekeeping reference gene (18S rRNA) using the comparative ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method.

### Western blotting

Cell extracts were prepared by homogenization in a buffer consisting of 20 mM Tris HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) and 2 mM sodium orthovanadate and 10 mM β-glycerophosphate as phosphatase inhibitors. Total protein from BAT was isolated by homogenization in a buffer consisting of 50 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, a protease inhibitor cocktail, 2 mM sodium orthovanadate and 10 mM β-glycerophosphate. Total protein (30 µg per lane) was resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on 12% or 15% gels and electrotransferred to Immobilon-P polyvinylidene difluoride membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Membranes were incubated with primary antibodies specific for UCP1 (ab10983, Abcam, Cambridge, UK), LC3B (no. 2775S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), p62/SQSTM1 (sc-25575, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA), Total-OXPHOS Rodent WB antibody cocktail (MS601, MitoSciences, Eugene, OR, USA) and/or α-TUBULIN (T9026, Sigma-Aldrich) and then with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (170-6516, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) or anti-rabbit IgG (711-035-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA), as appropriate. Signals were detected using a chemiluminescence horseradish peroxidase substrate (EMD Millipore). Densitometric analyses of digitalized images were performed using the Multi Gauge V3.0 (Fujifilm, Tokyo, Japan) software. Images were processed using Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems) for brightness and contrast adjustments, applied uniformly across the entire image.

### Oxygen consumption assay

Oxygen consumption in brown adipocytes was recorded using the Oxygen Biosensor System (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) following previously described procedures.<sup>24</sup> Primary brown adipocytes differentiated in culture were treated either with or without lysosome inhibitors for 6 h. Cells were then trypsinized, harvested in Dulbecco's modified Eagle's medium and placed in a 96-well BD Oxygen Biosensor System plate. Three independent cell cultures were used, and for each condition, four wells containing  $10^5$  cells and 200 µl of media were analyzed. Uncoupled respiration was determined by adding oligomycin ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) just before initiating the oxygen consumption recording. Fluorescent signal was read every 1 min for 60 min using a FLUOstar OPTIMA microplate reader (BMG Labtechnologies, Ortenberg, Germany). Fluorescent signal was normalized according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences). The relative oxygen

consumption was calculated using the linear parts of the curves of fluorescence.

#### Statistical analysis

Two-tailed unpaired Student's *t*-tests were used to test the statistical significance of differences between two experimental conditions. Welch's correction was applied when unequal variances were detected by *F*-test, using the GraphPad statistical software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical significance was set with an  $\alpha$ -value of  $P < 0.05$ , and underlying assumptions for validity of all tests were assessed. Data are presented as mean  $\pm$  s.e.m.

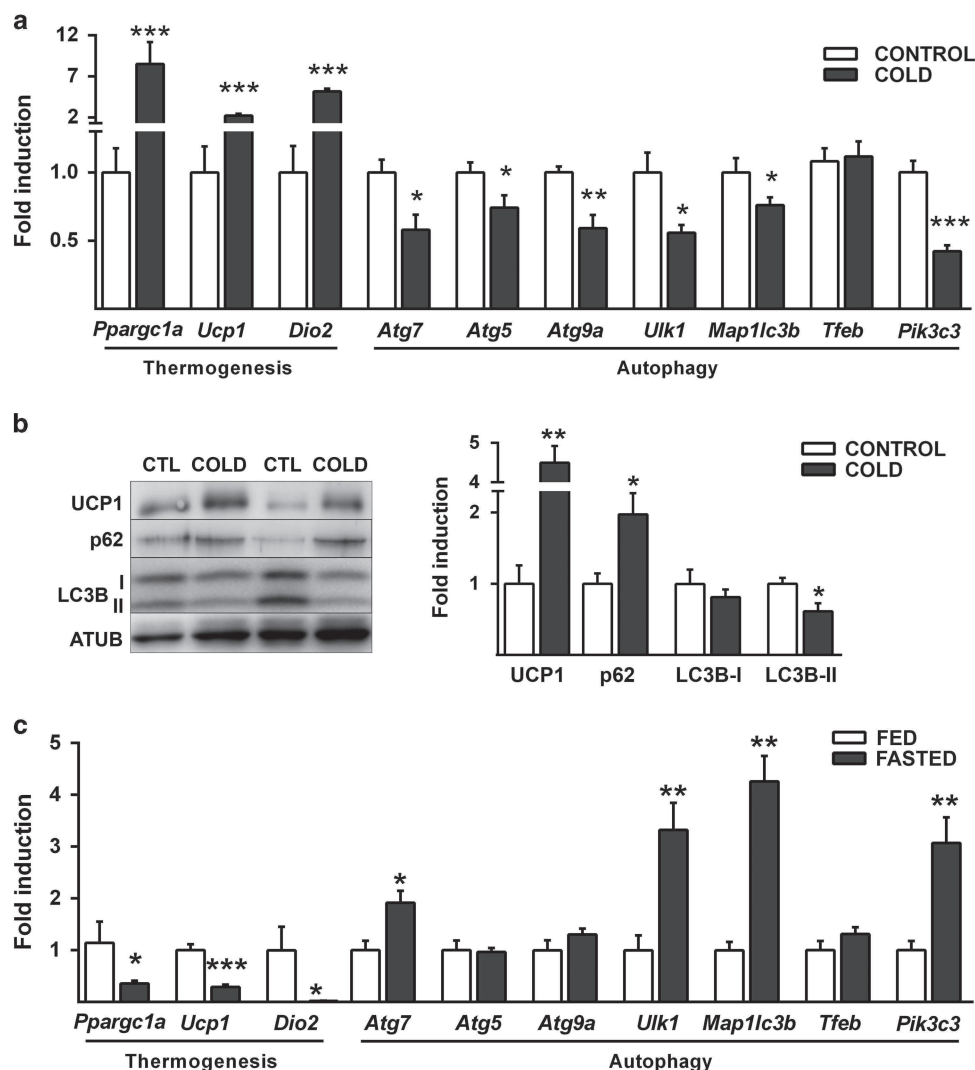
## RESULTS

### Thermogenic activation causes repression of autophagy in BAT

In order to determine how the autophagy cellular machinery responds to thermogenic activation of BAT, we first analyzed the effects of cold on the expression profile transcripts for autophagy components. Exposure of C57BL/6J mice to 4 °C for 24 h resulted

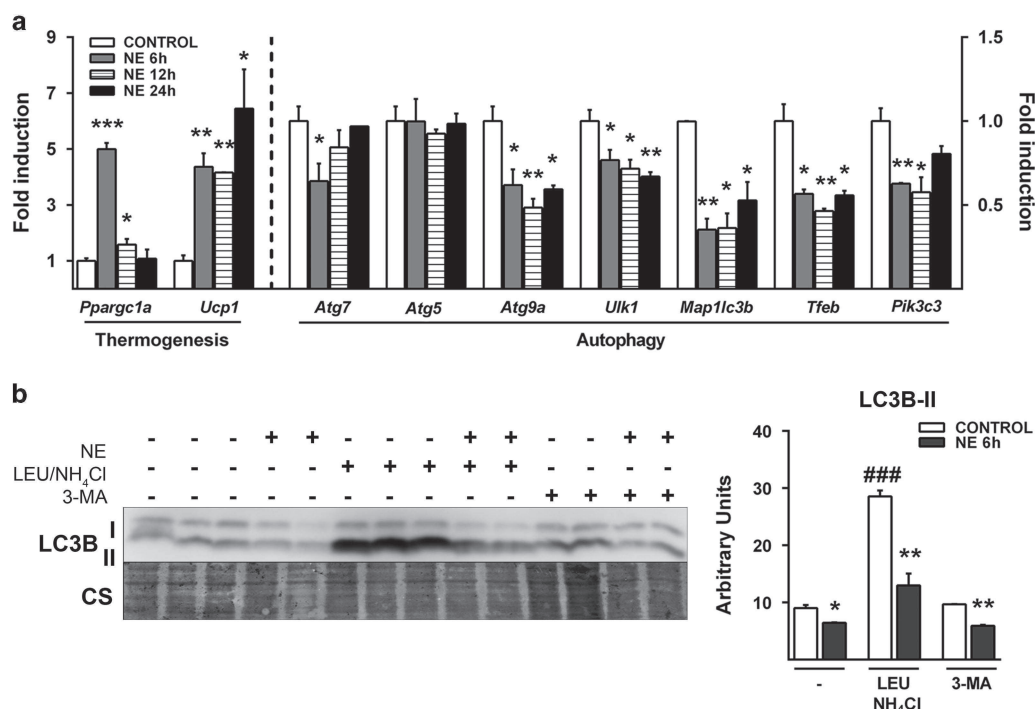
in a significant reduction in *Atg7*, *Atg5*, *Atg9a*, *Ulk1*, *Map1lc3b* and *Pik3c3* mRNA expression levels, accompanied by the expected increase in the expression of transcripts for the thermogenic marker genes *Ppargc1a*, *Dio2* and *Ucp1* (Figure 1a). Similar effects were found after cold exposure of mice from a distinct strain (Swiss ICR, CD-1) (Supplementary Table S2). To further determine whether this cold-induced reduction in transcript levels translated into a reduction in autophagic activity, we examined the levels of the phosphatidylethanolamine-conjugated microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (LC3B-II).<sup>25,26</sup> Immunoblotting analyses showed a significant decrease in total LC3B-II in BAT from cold-challenged mice compared with control mice, non-significant changes in LC3B-I protein along with an accumulation of the autophagic substrate of degradation p62 (Figure 1b), consistent with a reduction in autophagic flux. This was accompanied by the expected significant induction of UCP1 protein levels.

We analyzed a second model of reciprocal change in BAT thermogenesis: 24-h starvation. Fasting is a known inhibitor of BAT thermogenic activity in mice.<sup>27</sup> Consistent with this, we observed



**Figure 1.** Autophagy and thermogenesis are oppositely regulated in BAT. (a) Relative mRNA levels of thermogenic and autophagy-related proteins in BAT from cold-exposed C57BL/6J mice (24 h at 4 °C;  $n=7$ ) compared with control mice maintained at 22 °C ( $n=8$ ). (b) Immunodetection of phosphatidylethanolamine-conjugated LC3B (LC3B-II), LC3B-I, p62 and UCP1. Left: Representative immunoblot for the indicated proteins. Right: Relative amounts of the indicated proteins, determined by densitometry and adjusted using  $\alpha$ -TUBULIN (ATUB) as a loading control ( $n=6$ ). (c) Relative mRNA levels of thermogenic and autophagy-related proteins in BAT from fed and fasted (24 h) C57BL/6J mice ( $n=6$ ). The bars represent means  $\pm$  s.e.m. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).





**Figure 2.** Noradrenergic repression of autophagy in brown adipocytes. (a) Relative mRNA levels of thermogenic and autophagy-related genes in primary brown adipocytes from Swiss ICR (CD-1) mice in culture treated with NE and harvested at the indicated time points ( $n=3$ ). (b) Autophagic flux was assessed by measuring LC3B-II protein accumulation in differentiated brown adipocytes incubated with or without NE and treated with Leu/NH<sub>4</sub>Cl or 3-methyladenine. Left: Immunoblot for LC3B with Coomassie staining (CS) used as a loading control. Right: Relative amounts of LC3B-II determined by densitometry and adjusted using CS. The bars represent means  $\pm$  s.e.m. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , treated with NE vs control; ### $P < 0.001$ , with vs without inhibitors).

a strong repression of *Ppargc1a* and *Ucp1* expression at the transcript level in starved mice (Figure 1c) and the corresponding reduction in UCP1 protein levels (Supplementary Figure S1). A parallel assessment of autophagy-related transcripts revealed a systematic induction of *Atg7*, *Ulk1*, *Map1lc3b* and *Pik3c3* (Figure 1c). These results indicate an inverse relationship between thermogenic activation of BAT and induction of autophagic machinery components.

#### Noradrenergic repression of autophagy in brown adipocytes

In order to establish whether the effects of cold on the autophagic machinery observed *in vivo* occur in a cell autonomous manner and involve the noradrenergic pathway, the main mechanism of control of thermogenesis in BAT, we analyzed the effect of NE on brown adipocytes in culture. NE significantly reduced mRNA levels of the autophagy-related genes *Atg7*, *Atg9a*, *Ulk1*, *Map1lc3b*, *Tfeb* and *Pik3c3* in primary cultures of brown adipocytes from Swiss ICR (CD-1) mice (Figure 2a). Similarly, primary cultures from C57Bl/6J mice also showed a reduction in the mRNA expression of *Atg7*, *Atg9a*, *Map1lc3b*, *Tfeb*, *Ulk1* and *Pik3c3* (Supplementary Table S3). An investigation of the involvement of peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) and  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) signaling, thermogenic activity regulatory pathways with a potential role in the transcriptional regulation of autophagy,<sup>28,29</sup> showed that GW7647 and rosiglitazone, activators of the corresponding receptors, had no such repressive effect (data not shown).

To determine the effects of NE on autophagic flux, we incubated cells with or without NE and a combination of leupeptin and ammonium chloride (Leu/NH<sub>4</sub>Cl), added to inhibit lysosomal activity and degradation of autophagolysosome membrane-conjugated LC3B-II protein.<sup>26</sup> 3-Methyladenine, a general inhibitor of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activity, including that of PI3KC3, was also used to block earlier steps in autophagosome

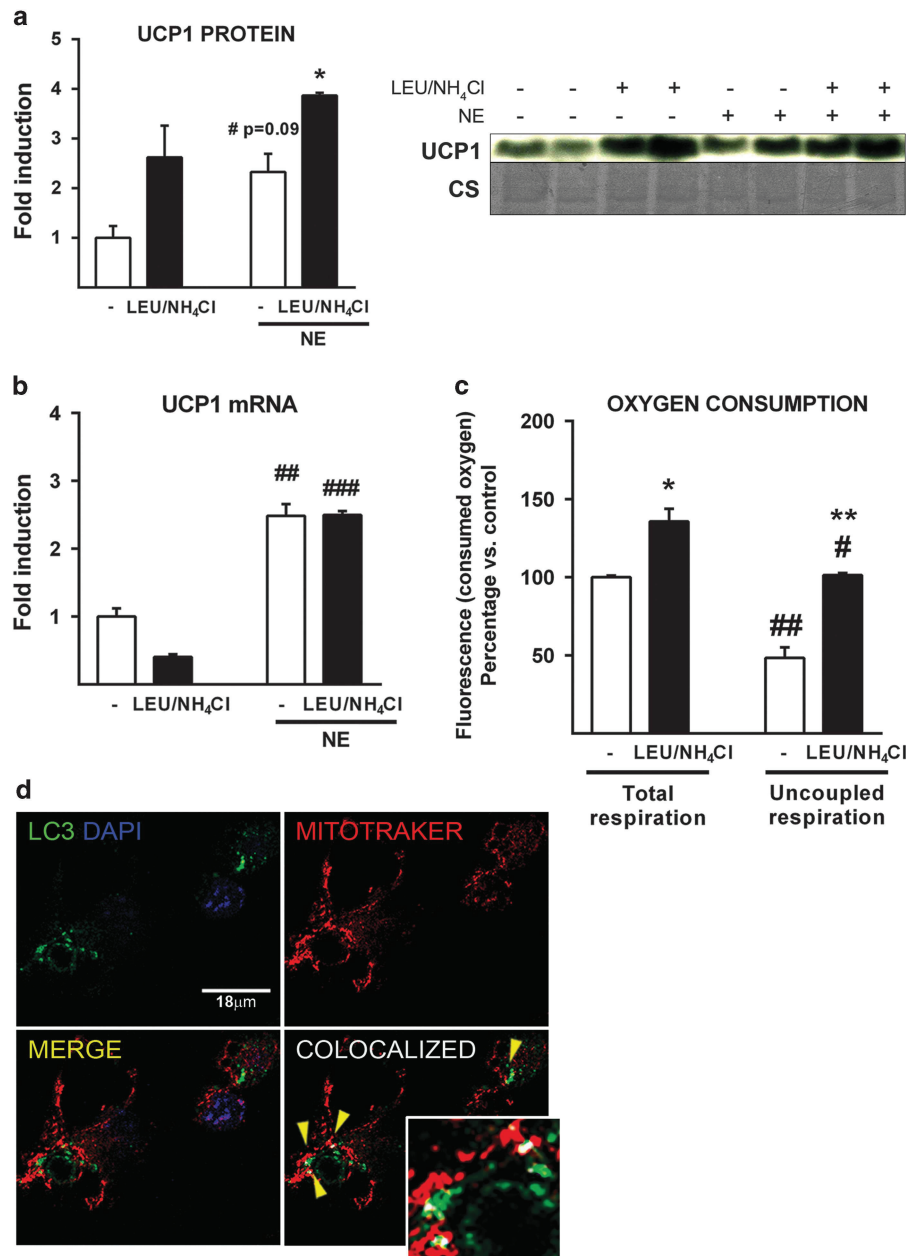
formation.<sup>26</sup> NE significantly reduced the extent of LC3B-II protein accumulation in the presence of Leu/NH<sub>4</sub>Cl compared with that in control conditions, indicating that NE represses the net autophagic flux (Figure 2b) but acts in a PI3KC3-independent manner.

#### Effects of blockage of lysosomal activity on brown adipocytes

We also analyzed the effects of blocking lysosomal activity in brown adipocytes on the regulation of UCP1, the mitochondrial protein conferring to brown adipocytes their specific oxidative thermogenic function. We found that the inhibition of the lysosomal degradation with Leu/NH<sub>4</sub>Cl caused an increase in UCP1 protein levels both under basal and NE-stimulated conditions (Figure 3a). However, the transcript levels of *Ucp1* were not increased compared with control cells (Figure 3b). These data suggest a role of autophagy in UCP1 protein turnover.

In order to test whether this UCP1 protein accumulation is associated with an increase in cell respiration, we measured brown adipocyte oxygen consumption. Leu/NH<sub>4</sub>Cl treatment caused a 35% induction in total respiration. Moreover, brown adipocytes treated with Leu/NH<sub>4</sub>Cl displayed 52% increase in uncoupled respiration (measured as the oligomycin-resistant respiration) (Figure 3c). These results suggest that inhibiting lysosomal degradation not only cause a UCP1 protein accumulation but also an increase in mitochondrial oxidative activity and especially the uncoupled respiration in brown adipocytes. The levels of several respiratory chain/oxidative phosphorylation subunits tended to be induced as a consequence of Leu/NH<sub>4</sub>Cl treatment but to a much lower extent than UCP1 (Supplementary Figure S2).

We further analyzed the putative interactions between autophagosomes and mitochondria in brown adipocytes by immunodetection of endogenous LC3 after Leu/NH<sub>4</sub>Cl treatment. We found that autophagosomes, detected as LC3 puncta, colocalized with mitochondria (Figure 3d), consistent with accumulation of



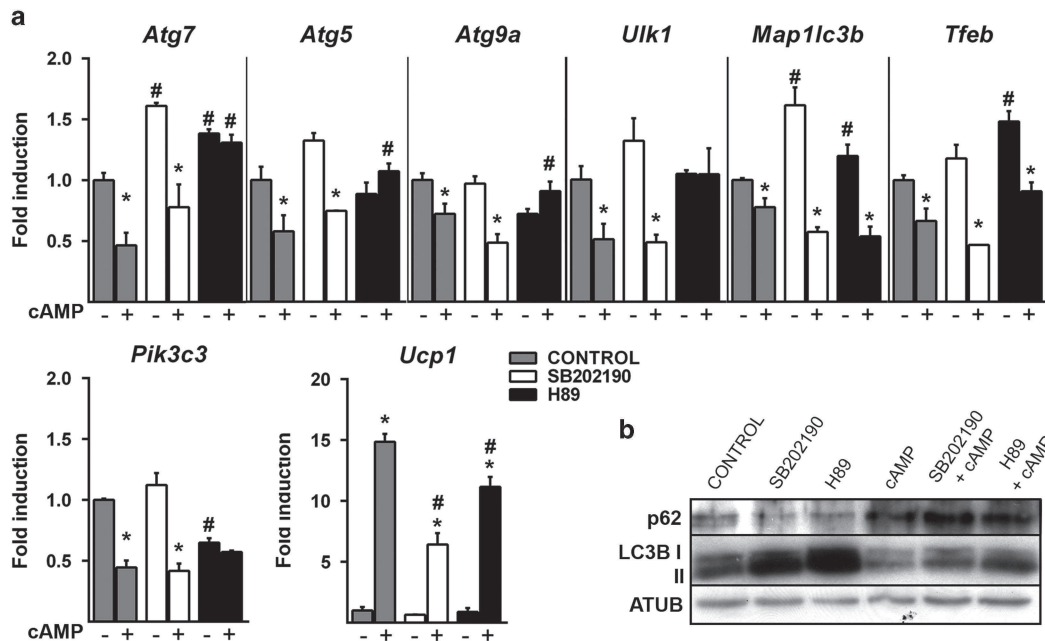
**Figure 3.** Autophagic degradation of UCP1 in brown adipocytes. **(a)** UCP1 protein levels in primary brown adipocytes from Swiss ICR (CD-1) mice in culture treated or not with Leu/NH<sub>4</sub>Cl and/or NE. Immunoblot for UCP1 and quantification using Coomassie staining (CS) as loading control ( $n=2$ ). **(b)** Relative mRNA levels of *Ucp1* ( $n=3$ ). **(c)** Total and uncoupled respiration of primary brown adipocytes in culture treated or not with Leu/NH<sub>4</sub>Cl ( $n=4$ ). **(d)** LC3 and mitochondria colocalization in differentiated brown adipocytes treated with Leu/NH<sub>4</sub>Cl. Mitochondria were stained with MitoTracker (red), nuclei were stained with DAPI and endogenous LC3 was immunostained with anti-LC3 antibody (green). Colocalized pixels in a single z-stack are shown in white and highlighted with yellow arrowheads. The bars represent means  $\pm$  s.e.m. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , treated with vs without NE; # $P < 0.05$ ; ## $P < 0.01$ ; ### $P < 0.001$ , treated with vs without inhibitors).

the UCP1 protein after inhibition of lysosomal activity, noted above. Mitochondrially associated LC3 puncta tended to accumulate in crown-like structures around lipid droplets (see below).

#### cAMP-mediated repression of autophagy in brown adipocytes

We determined whether the observed repressive effects of NE on autophagy were mediated by cAMP, the main intracellular signal transducer of noradrenergic action in brown adipocytes. Treatment with the cell-permeable cAMP analog dibutyryl-cAMP caused a significant reduction in transcript levels for *Atg7*, *Atg5*, *Atg9a*, *Ulk1*, *Map1lc3b*, *Tfeb* and *Pik3c3* (Figure 4a), in association

with the expected induction of *Ucp1* mRNA, results similar to those caused by NE exposure. We next explored the potential involvement of protein kinase A (PKA) and the mitogen-activated protein kinase p38 (p38-MAPK), the major intracellular mediators of cAMP-dependent thermogenic regulation in brown adipocytes, in the autophagic pathway. Exposure of brown adipocytes to either SB202190, a p38-MAPK inhibitor, or H89, an inhibitor of PKA, significantly reduced the cAMP-dependent expression of *Ucp1* mRNA as expected (Figure 4a). SB202190 and H89 also increased the basal mRNA levels of multiple autophagic genes. However, SB202190 did not suppress the cAMP-mediated reduction in the levels of autophagy-related transcripts, whereas H89 suppressed



**Figure 4.** cAMP-mediated repression of autophagy in brown adipocytes. Primary brown adipocytes from Swiss ICR (CD-1) mice in culture were treated with dibutyl cAMP (cAMP), H89 (PKA inhibitor) and/or SB202190 (p38-MAPK inhibitor) as indicated. **(a)** Relative mRNA levels of *Ucp1* and autophagy-related genes ( $n=4$ ). The bars represent means  $\pm$  s.e.m. (\* $P < 0.05$ , treated with vs without cAMP; # $P < 0.05$ , treated with vs without inhibitors). **(b)** Autophagic flux was assessed by comparing relative amounts of LC3B-II and p62 using immunoblotting.  $\alpha$ -TUBULIN (ATUB) was used as a loading control.

the inhibitory effects of cAMP on *Atg7*, *Atg5*, *Atg9a*, *Ulk1* and *Pik3c3* expression (Figure 4a).

Moreover, dibutyl-cAMP caused a reduction in LC3B-II protein levels accompanied by an increase in p62 accumulation (Figure 4b). These results confirmed that NE acts through cAMP to repress the autophagic machinery in brown adipocytes. Both kinase inhibitors increased LC3B-II protein levels under basal conditions and in the presence of cAMP (Figure 4b). Similar to other analyzed autophagic genes, *Map1lc3b* transcript levels were increased by treatment with SB202190 or H89 and reduced by treatment with dibutyl-cAMP (Figure 4a), indicating that transcriptional regulation may contribute to the changes in LC3B protein levels. Inhibition of PKA or p38-MAPK did not prevent the cAMP-mediated reduction in *Map1lc3b* mRNA or LC3B-II protein.

Repression of autophagy by cAMP in brown adipocytes involves disruption of lipid droplet/LC3 multivesicular structures

We monitored LC3 in brown adipocytes by immunofluorescent detection under basal and cAMP-exposed conditions. Under basal conditions, scattered LC3 puncta were present in the cytosolic compartment of brown adipocytes (Figure 5a, left). cAMP caused a dramatic reduction in the intensity and number of LC3 puncta per cell (Figure 4a, right), indicating a reduction in autophagy in response to cAMP. A further examination of the subcellular localization of LC3 in control brown adipocytes revealed that LC3-positive vesicles were often found in association with lipid droplets, forming crown-like structures (Figure 5b, left). Exposure of cells to cAMP caused a dramatic loss of these structures (Figure 5b, right).

Finally, we examined brown adipocyte subcellular structure by transmission electron microscopy. In non-thermogenically stimulated BAT, we observed the presence of multiple degradation vesicles consistent with an autophagolysosome structure (Figure 5c). Many of these vesicles contained small fat droplets, indicative of active lipophagy. However, this type of lipid degradation vesicle was largely absent in transmission electron microscopic images of BAT from cold-exposed mice (Figure 5c).

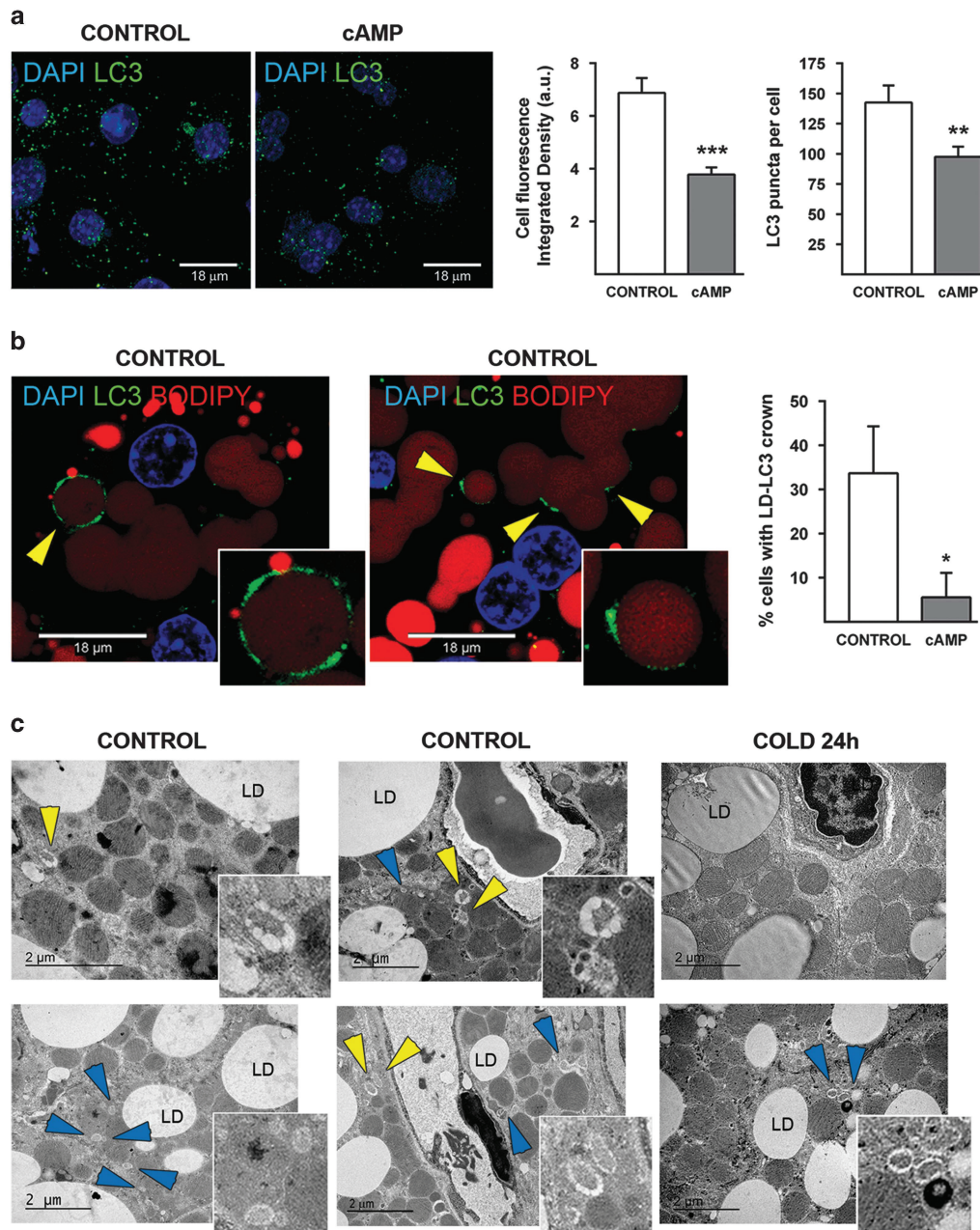
## DISCUSSION

In the present study, we report for the first time that repression of autophagy is a component of the cellular response of brown adipocytes to thermogenic activation. This repressive effect of noradrenergic stimuli is mediated by cAMP and activation of downstream intracellular kinases, mainly PKA. This indicates that autophagy repression is tightly and reciprocally coordinated with thermogenic activation of brown adipocytes, as both processes share similar intracellular pathways of regulation.

To date, the role of autophagy in BAT biology has been considered primarily in relation to *in vivo* differentiation/transdifferentiation processes in adipose depots. Previous reports have indicated that targeted ablation of autophagy machinery components in adipose tissues promotes enrichment of brown-vs-white adipocytes in adipose depots.<sup>20,21</sup> Our current finding that autophagy is repressed in response to thermogenic activation indicates a distinct role for autophagy in differentiated brown adipocytes that are tasked with acutely activating thermogenesis in response to a noradrenergic stimulus. In fact, this is consistent with early reports indicating repression of general proteolysis in brown adipocytes in response to NE, a finding suggestive of the involvement of autophagy.<sup>30</sup> Other biological processes induced during differentiation of brown adipocytes but repressed by noradrenergic stimulation of already differentiated cells (for example, PPAR $\gamma$  expression) have been reported previously.<sup>31</sup>

The coordinated repression of the expression of autophagy-related genes, in addition to the repression of autophagic flux itself, suggests that the negative regulation of autophagy in response to thermogenic activation involves transcription-mediated events. The operation of transcriptional processes in controlling autophagy in response to metabolic adaptations has been recently recognized in the liver, involving transcription factors such as the cAMP response element-binding protein (CREB).<sup>17,32,33</sup> In contrast to the stimulatory role in hepatocytes,<sup>33</sup> we found a repressive effect of cAMP on autophagy in brown adipocytes, similarly to other non-hepatic cells.<sup>34,35</sup> This marked cell-specific regulation is consistent with the





**Figure 5.** Induction of thermogenesis reduces LC3 puncta and lipophagy in brown adipocytes. (a) Left: Immunofluorescence detection of endogenous LC3 (green) in immortalized brown adipocytes from C57BL/6J mice incubated or not with dibutyl cyclic AMP (cAMP); nuclei were stained with DAPI (blue). Right: LC3 fluorescence and LC3 puncta per cell, measured using the ImageJ software. Images were obtained using confocal microscopy ( $n = 30$ ). (b) Left: Confocal images of a single z-stack showing LC3 crowns surrounding lipid droplets (LD) in differentiated brown adipocytes. LD were stained with BODIPY 558/568 C12 (red), and after fixation, cells were immunostained for LC3 (green) and stained with DAPI (blue). Right: Percentage of cells containing LD-LC3 vesicle crowns in confocal images ( $n = 5$ ). More than 25 cells for each condition were analyzed. (c) Representative transmission electron microscopic images of BAT from control and cold-exposed C57BL/6J mice (24 h at 4 °C). Yellow arrowheads indicate autophagolysosomes containing lipids. Blue arrowheads indicate autophagolysosomes containing cytoplasmic substrates without lipids. The bars represent means  $\pm$  s.e.m. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

distinct physiological roles of cAMP in these two different cell types: in hepatocytes, cAMP mediates starvation responses, whereas in brown adipocytes cAMP mediates thermogenic responses. On the other hand, the fact that experimentally induced repression of autophagy increases the levels of UCP1 and uncoupled mitochondrial respiration suggests that naturally occurring repression of autophagy by thermogenic stimuli contributes to the adaptive enrichment of cellular components required for heat production.

Noradrenergic, cAMP-mediated, repression of autophagy causes a marked reorganization of the intracellular autophagy machinery. Under basal conditions, the autophagy vesicles were tightly associated with lipid droplets and cells contained multiple intracellular structures with lipophagic vesicle-like features. Thermogenic activation caused a dramatic loss of these structures, consistent with a repression of lipophagy. Noradrenergic, cAMP-mediated induction of classical, hormone-sensitive lipolysis is a key process in brown adipocytes during activation of

thermogenesis. When thermogenesis is activated, free fatty acids derived from lipolysis of lipid droplets are rapidly utilized by mitochondria to sustain uncoupled respiration<sup>6</sup> The intracellular organization of brown adipocytes, with tight physical interactions between lipid droplets and mitochondria and long stretches of mitochondria embracing lipid droplet, likely favor this process.<sup>36</sup> Our findings are consistent with a scenario in which lipophagy, a mechanism of fat processing that is not directly linked to mitochondrial oxidation, is disfavored when fatty acid metabolism in lipid droplets is induced to provide fatty acids for direct use by mitochondria for oxidation. Further research will be needed to confirm this scenario of reciprocal activation of classical hormone-sensitive lipolysis and lipophagy in response to thermogenesis in BAT.

Lipophagy has been previously studied and found to be highly relevant for management of lipids in hepatic fat droplets.<sup>10,37</sup> However, it should be noted that the biological role of lipid droplets is markedly different in hepatocytes and brown adipocytes. Accumulation of lipid droplets is a pathogenic event in hepatocyte steatosis<sup>38</sup> that is often associated with lipotoxicity,<sup>39</sup> whereas it is a phenomenon associated with intrinsic biological function in brown adipocytes. Considering the much higher activity of hormone-sensitive lipolysis in BAT than in the liver,<sup>40</sup> it is likely that lipophagy has a less prominent role in fat catabolism in BAT than in the liver.

During the preparation of this article, it was reported that 1 h exposure of mice to cold elicits autophagy activation in BAT due to central and peripheral mechanisms.<sup>41</sup> The apparent contradiction of this observation with our current findings will deserve further research. However, the complex intracellular machinery associated with thermogenic activation in brown adipocytes (including UCP1 protein increase) is known to be minimally developed in such a very short-time cold exposure setting, and in fact, shivering is the major response to very short-time acute exposure to cold.<sup>6,42</sup>

Moreover, it may happen that autophagy repression does not necessarily have a significant role in situations of induction of BAT thermogenesis less intense or not as long as the 1 day cold exposure used in the current study. In fact, autophagy regulation is expectable to have a relevant role when overt remodeling of BAT in response to sustained changes in thermogenic activation is taking place.

In summary, we report that thermogenic activation of BAT is associated with repressed autophagy. This results in increased levels of thermogenic machinery components and repression of the autophagic pathway of lipid management (lipophagy) in the brown adipocyte. The inverse relationship between autophagy and BAT-mediated energy expenditure is consistent with numerous reports of abnormally high autophagy in adipose tissue from obesity,<sup>14,18,19</sup> a condition associated with reduced BAT activity. Thus, in light of the growing recognition on the relevance of BAT thermogenesis in the control of obesity, exploring autophagy regulation in BAT may provide novel tools for management of energy balance and their abnormalities to favor metabolic health.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from MINECO (SAF2014-55725), Instituto de Salud Carlos III-FEDER (PI11/00376 and PI14/00063), EU (FP7 project BETABAT, grant HEALTH-F2-2011-277713) and Generalitat de Catalunya (2014SGR-141). MC is a FPI fellow from MINECO, Spain.

## REFERENCES

- Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB *et al*. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 1993; **366**: 740–742.
- Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 2009; **9**: 203–209.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB *et al*. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009; **360**: 1509–1517.
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND *et al*. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 2009; **360**: 1500–1508.
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T *et al*. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009; **360**: 1518–1525.
- Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; **84**: 277–359.
- Villarroya F, Vidal-Puig A. Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab* 2013; **17**: 638–643.
- Gnad T, Scheibler S, von Kügelgen I, Scheele C, Kilić A, Glöde A *et al*. Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature* 2014; **516**: 395–399.
- Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; **6**: 463–477.
- Dong H, Czaja MJ. Regulation of lipid droplets by autophagy. *Trends Endocrinol Metab* 2011; **22**: 234–240.
- Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy and its role in physiology and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2010; **21**: 663.
- Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 823–830.
- Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 2014; **24**: 24–41.
- Kovsan J, Blüher M, Tarnowski T, Kloting N, Kirshtein B, Madar L *et al*. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**: E268–E277.
- Maixner N, Kovsan J, Harman-Boehm I, Blüher M, Bashan N, Rudich A. Autophagy in adipose tissue. *Obes Facts* 2012; **5**: 710–721.
- Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* 2011; **13**: 495–504.
- Sentrembre C, Ballabio A. Cell metabolism: autophagy transcribed. *Nature* 2014; **516**: 40–41.
- Jansen HJ, van Essen P, Koenen T, Joosten LA, Netea MG, Tack CJ *et al*. Autophagy activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. *Endocrinology* 2012; **153**: 5866–5874.
- Ost A, Svensson K, Ruishalme I, Brannmark C, Franck N, Krook H *et al*. Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. *Mol Med* 2010; **16**: 235–246.
- Singh R, Xiang Y, Wang Y, Baikati K, Cuervo AM, Luu YK *et al*. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J Clin Invest* 2009; **119**: 3329–3339.
- Zhang Y, Goldman S, Baerga R, Zhao Y, Komatsu M, Jin S. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 19860–19865.
- Martinez-Lopez N, Athonvarangkul D, Sahu S, Coletto L, Zong H, Bastie CC *et al*. Autophagy in Myf5+ progenitors regulates energy and glucose homeostasis through control of brown fat and skeletal muscle development. *EMBO Rep* 2013; **14**: 795–803.
- Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vazquez MJ *et al*. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 2012; **149**: 871–885.
- Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, Giral M, Iglesias R, Villarroya F. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* 2010; **11**: 206–212.
- Kabaya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T *et al*. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; **19**: 5720–5728.
- Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A *et al*. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016; **12**: 1–222.
- Trayhurn P, Jennings G. Nonshivering thermogenesis and the thermogenic capacity of brown fat in fasted and/or refed mice. *Am J Physiol* 1988; **254**: R11–R16.
- Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giral M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat

- uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* 2001; **276**: 1486–1493.
- 29 Sears IB, MacGinnitie MA, Kovacs LG, Graves RA. Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 3410–3419.
- 30 Moazed B, Desautels M. Differentiation-dependent expression of cathepsin D and importance of lysosomal proteolysis in the degradation of UCP1 in brown adipocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; **80**: 515–525.
- 31 Lindgren EM, Nielsen R, Petrovic N, Jacobsson A, Mandrup S, Cannon B *et al*. Noradrenaline represses PPAR (peroxisome-proliferator-activated receptor) gamma2 gene expression in brown adipocytes: intracellular signalling and effects on PPARgamma2 and PPARgamma1 protein levels. *Biochem J* 2004; **382**: 597–606.
- 32 Lee JM, Wagner M, Xiao R, Kim KH, Feng D, Lazar MA *et al*. Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy. *Nature* 2014; **516**: 112–115.
- 33 Seok S, Fu T, Choi SE, Li Y, Zhu R, Kumar S *et al*. Transcriptional regulation of autophagy by an FXR-CREB axis. *Nature* 2014; **516**: 108–111.
- 34 Cherra SJ 3rd, Kulich SM, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day BW *et al*. Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J Cell Biol* 2010; **190**: 533–539.
- 35 Shahnazari S, Namolovan A, Mogridge J, Kim PK, Brumell JH. Bacterial toxins can inhibit host cell autophagy through cAMP generation. *Autophagy* 2011; **7**: 957–965.
- 36 Cinti S. *The Adipose Organ*. Editrice Kurtis: Milan, Italy, 1999.
- 37 Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M *et al*. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009; **458**: 1131–1135.
- 38 Czaja MJ. Autophagy in health and disease. 2. Regulation of lipid metabolism and storage by autophagy: pathophysiological implications. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; **298**: C973–C978.
- 39 Wang DQ, Portincasa P, Neuschwander-Tetri BA. Steatosis in the liver. *Compr Physiol* 2013; **3**: 1493–1532.
- 40 Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A *et al*. Fat signals—lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab* 2012; **15**: 279–291.
- 41 Martinez-Lopez N, Garcia-Macia M, Sahu S, Athonvarangkul D, Liebling E, Merlo P *et al*. Autophagy in the CNS and periphery coordinate lipophagy and lipolysis in the brown adipose tissue and liver. *Cell Metab* 2016; **23**: 113–127.
- 42 Yu XX, Lewin DA, Forrest W, Adams SH. Cold elicits the simultaneous induction of fatty acid synthesis and beta-oxidation in murine brown adipose tissue: prediction from differential gene expression and confirmation in vivo. *FASEB J* 2002; **16**: 155–168.

Supplementary Information accompanies this paper on International Journal of Obesity website (<http://www.nature.com/ijo>)



## **Parkin, a novel actor in the control of brown adipose tissue activity**

**Revista:** Molecular Metabolism

**PMID:** [Enviat]

**Títol:** Parkin, un nou actor en el control de l'activitat del teixit adipós marró

### **Resum:**

Els teixit adipós marró (TAM) conté grans quantitats de mitocondris, els quals posseeixen una gran capacitat oxidativa per tal de sustentar l'activitat termogènica del teixit. La degradació selectiva de mitocondris (mitofàgia) és un mecanisme cel·lular de control de qualitat per al manteniment d'una xarxa mitocondrial en bon estat, d'especial importància en els teixits que presenten una alta capacitat oxidativa. La despolarització i fragmentació mitocondrial desencadena els processos de mitofàgia gràcies a l'activació de Parkin, una proteïna ubiquitina lligasa de tipus E3, per part de PINK1. En aquest estudi descrivim que l'expressió de Parkin és un fenomen que té lloc durant la diferenciació dels adipòcits marrons i durant el reclutament dels adipòcits beix, en paral·lel a l'adquisició de la capacitat termogènica. D'altra banda, l'expressió de Parkin es veu fortament reprimida en el TAM de ratolins durant l'activació termogènica, tant degut a un estímul de fred, com per un tractament amb l'agonista adrenèrgic beta-3 CL316243. Utilitzant adipòcits marrons en cultiu, vam trobar que la repressió de Parkin depèn de l'activació de la lipòlisis, doncs els inhibidors de la ATGL i HSL van evitar la regulació a la baixa de Parkin en resposta a l'estímul termogènic. D'una altra manera, Parkin es troba fortament induïda durant la desaclimatació al fred, una situació en la qual el TAM s'inactiva i que alhora implica la pèrdua massiva de proteïna mitocondrial al teixit. Sorprenentment, vam trobar que PINK1 es troba estabilitzada en els mitocondris del TAM, tant en el cas dels ratolins exposats al fred, com en el cas de ratolins desaclimatats. D'aquesta manera, la repressió de Parkin podria actuar de mecanisme regulador per tal de prevenir la degradació de mitocondris per mitofàgia degut a la despolarització que es troba intrínsecament associada a l'activació termogènica. D'acord amb la reciprocitat existent entre els nivells baixos de Parkin i l'activitat del TAM, els ratolins genèticament modificats per la falta d'expressió de Parkin (Parkin-KO) presenten una elevada activitat termogènica en el TAM i són resistent a l'obesitat induïda per una dieta rica en greixos.



## **Parkin, a novel actor in the control of brown adipose tissue activity.**

Montserrat Cairó<sup>1,2</sup>, Joan Villarroya<sup>1,2</sup>, Laura Campderrós<sup>1,2</sup>, Aleix Gavalda-Navarro<sup>1,2</sup>,  
Rubèn Creijo<sup>1,2</sup>, Tania Quesada-López<sup>1,2</sup>, Marta Giralt<sup>1,2</sup>, Francesc Villarroya<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Catalonia, Spain. <sup>2</sup>CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutrición, Spain.

**Keywords:** brown adipose tissue, thermogenesis, mitophagy, autophagy, obesity

### **Corresponding author:**

Francesc Villarroya, PhD

Department of Biochemistry and Molecular Biology

Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Avda Diagonal 643

08028-Barcelona, Spain

Tel. 34934021525

FAX 34934021559



## **ABSTRACT**

Brown adipose tissue (BAT) possesses large amounts of mitochondria with a high oxidative capacity to sustain its thermogenic activity. Selective autophagic degradation of mitochondria (mitophagy) is a quality control mechanism for maintaining a healthy mitochondrial network, especially in tissues with a high oxidative capacity. Mitochondrial depolarization and fragmentation triggers mitophagy through the PINK1-mediated recruitment and activation of the ubiquitin-E3 ligase Parkin. We found that Parkin expression is induced during brown adipocyte differentiation and during beige adipocyte recruitment, in parallel with the acquisition of the thermogenic capacity. However, Parkin is strongly repressed during cold-induced thermogenesis in mice and after a chronic treatment with the beta-3 adrenergic agonist CL316243. Using brown adipocytes in culture, we found that Parkin repression is dependent on lipolysis activity, as inhibition of ATGL and HSL prevents the Parkin down-regulation induced by thermogenic stimuli. Otherwise, Parkin is strongly induced during cold-deacclimation, a situation of BAT inactivation associated with a massive loss of mitochondrial protein. Surprisingly, we found that PINK1 is stabilized in BAT mitochondria from both cold-challenged and cold-deacclimated mice. Thus, Parkin down-regulation may be a regulatory mechanism to prevent mitochondria degradation by mitophagy after the mitochondria depolarization and fragmentation intrinsically associated with thermogenic activation. In accordance with the reciprocal association between low Parkin levels and BAT activity, mice lacking Parkin (Parkin-KO) had an enhanced thermogenic activity of BAT and were resistant to diet-induced insulin resistance and obesity.



## INTRODUCTION

Brown adipose tissue (BAT) is the main site of non-shivering thermogenesis, a mechanism of heat production that enables the organism to adapt to a cold environment. Brown adipocytes possess large amounts of mitochondria with a high oxidative capacity due to the expression of uncoupling protein 1 (UCP1) [1]. UCP1 provides a unique proton permeability to the mitochondrial inner membrane which enables the use of metabolic energy for heat production instead of ATP synthesis, thus leading to high oxidation rates. Moreover, energy expenditure derived from BAT thermogenic activity provides a protective mechanism against excessive body weight and fat accumulation in response to overfeeding [2, 3].

BAT is a highly plastic tissue and hypertrophic and hyperplastic processes take place to enlarge BAT size in response to enhanced thermogenic needs, such as cold environment [4]. Conversely, BAT atrophies for adapting to low thermogenic demands, such as in warm environments, underfeeding or physiological conditions such as pregnancy and lactation [2, 4]. The regulation of mitochondrial amounts and mitochondrial thermogenic machinery (e.g. UCP1 levels) is essential to provide such plasticity [5, 6]. Moreover, the appearance of the brown adipocyte-like (mitochondria enriched, UCP1-containing) beige cells in white adipose tissue (WAT) depots when thermogenic needs are high (the so-called "browning" process) is an added feature of the cellular adipose plasticity in response to adaptive thermogenesis [7-9].

Autophagy is a catabolic process that contributes to the maintenance of cellular homeostasis by removing intracellular components, like damaged or no longer needed organelles, for its degradation inside lysosomes [10]. Autophagy has an important role in cellular adaptive changes to physiological and pathological challenges, for example, providing energy substrates during nutrient deprivation [11, 12]. The selective degradation of mitochondria (mitophagy) is a quality control mechanism

that contributes to the maintenance of a healthy mitochondrial network by eliminating dysfunctional mitochondria [13]. Mitophagy can also have a role in cellular remodeling events that take place during adaptive processes and differentiation, for example in removal of mitochondria from maturing erythrocytes [14]. The main stimuli that triggers mitophagy is mitochondrial depolarization, sensed by the PTEN-induced putative kinase (PINK1) and Parkin system, leading to the recruitment of autophagic receptors, like p62/SQSTM1, that serves as bridges between depolarized mitochondria and the autophagic machinery [15]. PINK1 is stabilized in the membrane of depolarized mitochondria and recruits the E3-ubiquitin ligase Parkin [16, 17], which in turn ubiquitylates numerous outer mitochondrial membrane proteins to recruit the autophagic adaptors and initiate mitophagy [15]. Autophagy has been described as a mechanism regulating adipocyte differentiation and function. Studies using genetically-modified mice models have reported impaired adipogenesis in autophagy-deficient adipocytes [18-21]. Interestingly, these previous studies also described an induction of browning as a result of the impairment of autophagy in adipocytes [19, 21]. Recently, we and others have reported the relationships of thermogenesis and autophagy in brown and beige adipose tissues. We reported that autophagy is repressed in response to thermogenic activation whereas repression of autophagy leads to increased brown adipocytes thermogenic activity [22]. On the contrary, it has been also reported that very short term exposure to cold can activate the selective autophagic degradation of lipids (lipophagy) in BAT and liver to support lipolysis and provide oxidative substrates to mitochondria [23]. More recently, Kajimura et al. reported that autophagy contributes to mitochondria clearance during beige adipocytes inactivation, enabling beige-to-white transition, thus acting as a negative regulator of thermogenic capacity [24]. However, the role of mitophagy in the control and maintenance of BAT thermogenic activity is largely

unknown. Here we identify Parkin as a new regulatory factor under the control of thermogenic stimulus, acting as a negative modulator of BAT activity. We also provide evidence suggesting a scenario in which Parkin acts as a key-regulating point of mitophagy, downstream of PINK1, in the context of BAT thermogenic regulation.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animal experiments**

Experiments using wild-type animals were conducted on 2-3 months old C57Bl/6J male mice (Harlan Laboratories, Sant Feliu de Codines, Spain). Animals were maintained at the standard animal facility temperature (22°C), at thermoneutrality (29°C) or exposed to cold (4°C) as stated in each experiment. Unless otherwise specified all the animals were maintained under 12 h dark/light cycle with *ad libitum* access to food and water. For experiments of cold acclimation, mice were single-caged and maintained at 4°C during 1 day (acute) or 21 days (chronic). For experiments of cold-deacclimation mice were first acclimated to cold during 21 days and then divided in 3 experimental groups (matched by age and weight): cold-acclimated (used as controls), deacclimated at thermoneutrality during 1 day, or deacclimated at thermoneutrality during 7 days. When indicated mice were injected intraperitoneally 1 mg/kg of CL 316,243 or saline daily during one week. Mice were sacrificed by decapitation and blood and tissues were collected. Tissues were dissected, weighted, and frozen for further mRNA and protein analysis, or fixed and processed for microscopy analysis (see below).

All experiments were performed in accordance with the European Community Council directive 86/609/EEC and experiments as well as the number of animals to be used were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Barcelona.

### **Parkin-KO mice studies**

Parkin-KO (B6.129S4-Park2tm1Shn/J) mice were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) and wild-type littermates were used as controls.

For diet-induced obesity studies, 3 months old mice were fed with a standard diet (2018; Teklad Diet, Harlan Laboratories) or with a high fat diet (D12451; Research Diets Inc., New Brunswick, NJ) for 2 months. Insulin tolerance test (ITT) was performed in the evening after a short fasting (2 h); mice were injected intraperitoneally with 0.75 IU/kg insulin (Actrapid; Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) and glucose levels were measured using blood samples collected from the tail-vein. For analysis of responsiveness to cold, Parkin-KO mice and wild-type littermates were single-caged and exposed to 24 h of cold.

### **Serum biochemistry**

Glucose and triglyceride levels were measured using Accutrend Technology (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). FGF21 levels were quantified with ELISA (RD291108200R, Biovendor). Insulin, adipokines and cytokines were quantified using a Multiplex system (MADKMAG-HK, Millipore); and NEFA and 3-hydroxybutyrate plasma levels were quantified using Wako HR series NEFA-HR(2) and Wako Autokit Total Ketone Bodies, respectively (Wako Chemicals; Neuss, Germany).

### **Thermography imaging**

Surface temperatures were recorded using a T335 infrared digital thermography camera (FLIR Systems, Wilsonville, OR, USA), which features a thermal sensitivity of 0.1 °C and an image resolution of 640x480 pixels. Environmental parameters (relative humidity, room temperature and reflected apparent temperature) were measured in situ and set in the camera as parametrical inputs from the experiment. Mice were shaved and after two days of recovery infrared pictures of the non-anaesthetized animals were taken from a distance of 30 cm. The resulting images were analyzed with the FLIR QuickReport software package (FLIR Systems) in order

to normalize temperature ranges and to quantify temperature values arising from the isotherms. Maximal temperature values from the interscapular area were compared between genotypes.

### **Optical and electron microscopy**

For hematoxylin and eosin (H&E) staining, tissue samples were fixed in 4% formalin overnight, paraffin-embedded and processed according standard procedures. Preparations were observed with optical microscope. For electron microscopy analysis, tissue samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and postfixed in 1% osmium tetroxide and 0.8% FeCNK in phosphate buffer. After dehydration in a graded acetone series, tissue samples were embedded in Spurr resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Jeol 1010 transmission electron microscope (Izasa Scientific, Barcelona, Spain).

### **RNA-seq and RNA-seq data analysis**

For analysis of cold-induced genes, we used RNAseq-based database (GSE77534, GEO), obtained in BAT from mice exposed at 4°C for 24 h versus mice kept at thermoneutrality (29°C). Retrieval of cold-induced transcripts was performed as reported previously [25]. To define the genes that were upregulated or downregulated by cold, the fold change was calculated as the proportion between the sum of the RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) for all gene transcripts under the cold condition and the same sum in control condition. Significance was tested using a Fisher's exact test (the number of reads mapped to a given gene and number of reads mapped to all other genes in the cold condition versus the control condition) and corrected by the Benjamini-Hochberg method

(taking for each gene the four samples as independent tests). A difference in gene expression was considered significant if the corrected P value was  $<0.05$ . As additional criteria, a gene was considered to be 'modified by cold' only if its expression changed significantly in the same direction—that is, 'up' or 'down'—in at least three out of four samples per group and no significant change in the opposite direction was observed.

### **Cell culture and reagents**

Primary cultures of brown adipocytes were obtained by first isolating preadipocytes from interscapular, cervical, and axillary BAT depots from 3 weeks old Swiss ICR (CD-1) mice (Harlan Laboratories). Isolated precursor cells were then plated and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F12 Medium (1:1) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) or charcoal-stripped serum (CSS), 1% Fungizone, 20 nM insulin, 2 nM T3, and 100  $\mu$ M ascorbate. Experiments were performed on day 10 of culture, at which point more than 90% of cells were considered to be differentiated on the basis of lipid accumulation and brown adipocyte morphology. When indicated, cells were treated with 0.5  $\mu$ M norepinephrine, 1 mM dibutyryl cAMP, 5  $\mu$ g/mL actinomycin D, 20  $\mu$ g/mL cycloheximide, 10 mM 3-methyladenine (3-MA), 10  $\mu$ M H89, 10  $\mu$ M SB202190, 10  $\mu$ M Atglistatin, 10  $\mu$ M CAY10499 (Cayman chemical, MI, USA), 1  $\mu$ M GW7647, 1  $\mu$ M all-*trans*-retinoic acid. Glycerol concentration in the media was determined with spectrophotometric methods (Sigma Aldrich, MO, USA).

### **RNA isolation and real-time quantitative PCR**

RNA from tissues and cells was extracted using a NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and the levels of mRNA were determined by quantitative

reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), using the corresponding TaqMan probes (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Supplementary Table 1). The mRNA level of each gene of interest was normalized to that of a housekeeping reference gene (*18S* rRNA) using the comparative ( $2^{-\Delta Ct}$ ) method.

### **Western blotting**

Cell extracts were prepared by homogenization in a buffer consisting of 20 mM Tris HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) and 2 mM sodium orthovanadate and 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate as phosphatase inhibitors. Total protein from BAT was isolated by homogenization in a buffer consisting of 50 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, a protease inhibitor cocktail, 2 mM sodium orthovanadate, and 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate. Total protein was measured using Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Fisher Scientific SL, Madrid, Spain), and 40 $\mu$ g of protein were resolved in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 12 or 15% gels and electrotransferred to Immobilon-P polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Membranes were incubated with primary antibodies specific for Parkin (#2132, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), PINK1 (BC100-494, Novus Biologicals, Littleton, CO), UCP1 (ab10983, Abcam, Cambridge, UK), LC3B (#2775S, Cell Signaling Technology), p62/ SQSTM1 (sc-25575, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX), PGC1 $\alpha$  (sc-13067, Santa Cruz Biotechnology Inc.),  $\beta$ -actin (A5441, Sigma-Aldrich), and then with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (170-6516, Bio-Rad, Hercules, CA), or anti-rabbit IgG (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology Inc.), as appropriate. Signals were detected using a chemiluminescence-HRP substrate (EMD Millipore). Densitometric analyses



of digitalized images were performed using Multi Gauge V3.0 (Fujifilm, Tokyo, Japan) software Images were processed using Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, San José, CA, USA) for brightness and contrast adjustments, applied uniformly across the entire image.

### **Parkin promoter activity assay**

HIB-1B cells were cultured in DMEM and transiently transfected with the pGL4-*Park2*-Luc plasmid vector containing the 5'-flanking region (-800 to +120) of the mouse Parkin gene [26], following previously described procedures [27]. Empty pGL4 vector was used as a control for the basal luciferase activity and the pRL-CMV expression plasmid for the sea pansy (*Renilla reniformis*) luciferase was used as a control of transfection efficiency (Promega, Madison, WI, USA). 24h after transfection cells were treated with norepinephrine or dybutiryl-cAMP for further 24hrs. Firefly and Renilla luciferase activities were measured with the Turner Designs luminometer (TD 20/20) using the Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega). Firefly luciferase activity of transfected cells was normalized using Renilla luciferase activity.

### **Statistical analysis**

Statistical significance was assessed by using two-tailed unpaired Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by Dunnet or Tukey *post-hoc* tests, or two-way ANOVA, with the GraphPad statistical software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Welch's correction was applied when unequal variances were detected by *F*-test. Statistical significance was set with an  $\alpha$ -value of  $P < 0.05$ , and underlying assumptions for validity of all tests were assessed. Data are shown as means  $\pm$  s.e.m.

## RESULTS

### Thermogenic stimuli repress Parkin expression in BAT and beige adipose tissue.

We analyzed the pattern of expression of autophagy-related genes in a RNAseq database that we had generated comparing transcript level changes in interscapular BAT (iBAT) from mice exposed 24 h to cold (4°C) relative to iBAT from mice maintained at thermoneutral temperature (29°C) [25] (Fig.1A). We observed that, whereas genes implicated in advanced stages of the autophagosome formation (*Atg5*, *Atg2a*, *Atg2b*, *Atg3*) or in recycling autophagic components (*Atg4a*, *Atg4b*, *Atg4*, *Atg4d*), were mostly upregulated in response to thermogenic activation, genes implicated in the initiation complexes (*Ulk1*, *Ulk2*, *Pik3c3*, *Atg16l1*, *Atg14*) were downregulated, except for *Atg13*. Interestingly, *Park2*, followed by *Pink1*, both implicated in the selective degradation of mitochondria, was the most intensely downregulated autophagy-related gene. In accordance with RNAseq data, iBAT from mice exposed to cold during 1 day showed a dramatic decrease (63%) in Parkin transcript levels as assessed by qRT-PCR (Fig1.B left), as well as a marked reduction of Parkin protein levels (Fig1.B right). Parkin downregulation by cold was not observed in WAT: sWAT showed a significant increase in Parkin mRNA levels after 1 day of cold and we did not observe any significant change in Parkin transcript levels in eWAT. (Fig1.C). To analyze Parkin regulation in beige adipocytes, we exposed mice to cold during 21 days (chronic acclimation) to induce *browning* of WAT. Cold-induced *browning* leads to the reduction of Parkin transcript levels in sWAT; however, eWAT, less prone to *browning*, did not show any change in Parkin mRNA levels even after long term cold exposure (Fig1.C). Parkin expression levels were partially recovered in iBAT from 21 days cold exposed mice (Fig1.B). We treated mice with the specific  $\beta$ 3-adenoreceptor ( $\beta$ 3-AR) agonist CL316,243 during one week to mimic the

sympathetic thermogenic stimulus occurring during cold adaptation. Parkin transcript levels were reduced in brown and beige adipose tissue of mice treated with CL316,243 compared control mice treated with saline (Fig1.D).

### **Parkin expression is associated with brown adipocytes differentiation.**

We found that Parkin, like UCP1, is preferentially expressed in mature brown adipocytes rather than in the stromal vascular fraction (SVF) (Fig2.A). We analyzed the expression profile of Parkin mRNA during brown adipocyte differentiation using primary brown adipocytes in culture. We found that Parkin mRNA was progressively induced since the first days of differentiation (Fig2.B) of brown adipocyte precursor cells, in parallel with the induction of the mitochondrial biogenesis and the progressive acquisition of the thermogenic machinery (e.g. UCP1 expression). Moreover, when brown adipocytes precursor cells were cultured with charcoal-stripped serum (CSS), which allows proliferation but not differentiation, Parkin mRNA levels (like UCP1 mRNA) remained at low levels compared with differentiated brown adipocytes that were differentiated in media supplemented with FBS (Fig2.C).

### **Noradrenergic stimuli repress Parkin expression in brown adipocytes**

Norepinephrine (NE) is the major mediator of BAT thermogenic activation, acting mainly via the  $\beta$ 3-AR, and increasing the intracellular levels of cyclic AMP (cAMP). To establish whether the effects of cold and of  $\beta$ 3-AR activation on Parkin expression observed *in vivo* occur in a cell autonomous manner, we treated brown adipocytes in culture with NE or with the cell-permeable cAMP analog dibutyryl-cAMP. Both thermogenic inductors mimicked the repressive effects of cold on Parkin mRNA and protein levels, whereas increased the UCP1 mRNA expression levels, as expected (Fig2.D and E). Since Parkin can be degraded during the process of mitophagy, we

used the autophagic inhibitor 3-methyladenine (3-MA) to evaluate the possible contribution of autophagy in the decrease of Parkin protein levels. 3-MA treatment slightly blunted but not abolished the NE- and cAMP-mediated decrease in Parkin protein levels (Fig2.E). Given that Parkin downregulation appears to be predominantly mediated by a reduction in Parkin mRNA levels, we analyzed the effects of blocking protein synthesis and mRNA synthesis using cycloheximide (CHX) and actinomycin D, respectively, in NE-treated primary brown adipocytes in culture. NE caused a significant reduction of Parkin mRNA levels in the presence of CHX, indicating that the effect of NE did not require protein synthesis (Fig2.F). Moreover, actinomycin D promoted a decrease in Parkin mRNA levels to a similar extent to that caused by NE with no additive effects (Fig2.G), indicating that NE does not act causing a specific destabilization of Parkin mRNA. To investigate if NE and cAMP were affecting the transcription of the Parkin gene (*Park2*), we transfected HIB-1B brown adipocyte-derived cells with a plasmidic luciferase reporter construct driven by a 920-bp fragment of the 5'-flanking region (-800 to +120) of the mouse Parkin gene (pGL4-*Park2*-Luc). Both NE and cAMP treatment caused a significant decrease in the promoter activity of Parkin gene (Fig2.H). We concluded that NE- and cAMP-mediated Parkin down-regulation in brown adipocytes occurs mainly through the repression of the transcription of the Parkin gene, with no evidence of significant post-transcriptional processes. Exposure of brown adipocytes to H89, an inhibitor of PKA, or SB202190, a p38-MAPK inhibitor, significantly reduced the cAMP-dependent expression of UCP1 mRNA but had no effect in Parkin repression (Fig3.A). This indicated that protein kinase A (PKA) and the mitogen-activated protein kinase p38 (p38-MAPK), the major intracellular mediators of NE-cAMP-dependent thermogenic induction in brown adipocytes, were not involved in the repression of Parkin gene expression in response to NE or cAMP. Since the activation of lipolysis accompanies

thermogenic induction to fuel mitochondrial oxidation, we used the inhibitor of adipose triglyceride lipase (ATGL) Atglistatin, and the inhibitor of hormone sensitive lipase (HSL) CAY10499 in brown adipocytes in culture. Both inhibitors decreased the cAMP-induced lipolysis (assessed as glycerol in cell culture media, derived from the hydrolysis of cellular triglycerides) and the combination of the two inhibitors blocked it completely (Fig3.B right). We found that Atglistatin blunted slightly the cAMP-mediated repression of Parkin whereas CAY10499 prevented it almost completely (Fig3.B left). In fact, the treatment of cells with H89 (an inhibitor of PKA) at the concentrations used, despite blocking the UCP1 induction by cAMP, was noneffective in reducing cAMP-mediated lipolysis activation. (Supplementary Fig.1). Overall the free fatty acids production derived from lipolysis appear to be required for Parkin repression, independently of PKA-p38MAPK. We then analyzed the effects of several inducers of thermogenic activity that act independently from beta-adrenergic pathways in brown adipocytes. GW7647, an activator of PPAR $\alpha$ , caused a reciprocal effect on Parkin (downregulation) and UCP1 (up-regulation) gene expression similar to that elicited by beta-adrenergic pathways (Fig. 3C). All-trans-retinoic acid, a thermogenic activator that induces UCP1 expression independently of both PKA-p38MAPK and fatty-acid related pathways, not only did not reduced Parkin mRNA expression levels, but increased it slightly (Fig. 3C). This confirms the existence of fatty acid-related mechanisms for down regulation of the Parkin gene in brown adipocytes.

### **Parkin-KO mice show over-activated BAT and are protected against high-fat diet-induced gain weight and insulin resistance.**

Considering the strong reciprocal regulation between Parkin levels and thermogenic activity in BAT, we determined the role of experimental suppression of Parkin on BAT

thermogenic activity and related systemic parameters using a Parkin-KO mice model. Parkin-KO mice showed reduced body weight, reduced liver weight, and reduced iBAT size whereas WAT depots tended to show reduced size also (Table 1). This was associated with reduced food intake. Optical and electronic microscopy images revealed a decrease in the droplet size in brown adipocytes in iBAT from Parkin-KO compared to wild-type mice (Fig4.A), resulting in lesser lipid content. Parkin-KO mice had increased surface body temperature in the interscapular area (corresponding to the site of iBAT thermogenesis) compared to wild-type mice (Fig4.B), indicating enhanced iBAT thermogenic activity. Moreover, iBAT from Parkin-KO mice had increased UCP1 protein levels (Fig4.C) and enhanced mRNA expression of several genes involved in thermogenesis (*Ucp1*, *Ppargc1a* and *Dio2*) (Fig4.D). When we exposed wild-type and Parkin-KO mice to acute cold (24 h, 4°C), the physiological situation in which Parkin expression is reduced in iBAT, we found that cold induced the expression of the thermogenesis-related genes to a similar extent in wild-type and Parkin-KO mice, except for the thermogenesis-related, secretable factors FGF21 and IL-6, that were over-induced in Parkin-KO mice in response to cold (Fig4.D). Overall, these data were consistent with an over-activation of iBAT from mice lacking Parkin. To analyze the potential protective effects against obesity of the enhanced thermogenic activity observed in Parkin-KO mice, we fed wild-type and Parkin-KO mice with a normal chow diet (ND) or with a high fat diet (HFD) for 8 weeks. We found that Parkin-KO mice were resistant to HFD-induced weight gain (Fig5.A). The expansion of adipose tissues in response to HFD was reduced, and, accordingly, circulating leptin levels tended lower and circulating triglycerides were unchanged (Table 1). Unlike what occurred in ND, reduced food intake was not statistically significant between genotypes under HFD. Moreover, Parkin-KO mice were protected against the metabolic complications associated with obesity: while 7 weeks of HFD

where enough to induce insulin resistance in wild-type mice, Parkin-KO maintained unaltered insulin sensitivity. (Fig5.B). Moreover, Parkin-KO mice did not develop HFD-induced hyperinsulinemia occurring in wild-type mice after the HFD (Fig5.C). Under HFD conditions, the expression of genes involved in thermogenic activity were enhanced (*Ppargc1a*, *Dio2*, *Cox7a1*) or tended higher (*Ucp1*) in Parkin-KO mice relative to wild-type mice (Fig5.E). We did not find significant changes in Parkin transcript levels due to the HFD in wild-type mice (Fig5.D). Analysis of mRNA relative expression levels of genes related to energy metabolism in liver from wild-type and Parkin-KO mice under normal and high fat diet revealed minor alterations. Multivariate ANOVA indicated that HFD increases *Ppara*, *Mcad*, and *Fgf21* significantly ( $P < 0.05$ ) but no significant effect of the genotype was found (Supplementary Table 2). Accordingly, no significant differences were detected in ketone bodies, non-esterified fatty acids and FGF21 plasma levels due to genotype (Table 1).

### **Deacclimation to cold induces Parkin expression and mitophagy in BAT.**

Given that Parkin is known to be part of the mechanisms that promotes the autophagic degradation of mitochondria, and we found a reciprocal regulation of Parkin expression and thermogenic activation in BAT, a situation of increased mitochondrial biogenesis, we hypothesized that Parkin could be involved in BAT mitophagy. To test this, we used cold deacclimation as a model of BAT inactivation involving protein loss. Cold-acclimated mice were used as controls and we analyzed the impact of deacclimation exposing cold-acclimated mice to thermoneutrality (29°C) during 1 day or during 7 days. First, we observed that mice lost 25% of the total iBAT protein after 1 day of deacclimation, and 50% of the total iBAT protein had disappeared after 7 days at thermoneutrality (Fig6.A top). This was accompanied by a progressive accumulation of fat replacing iBAT protein (Fig6.A bottom), thus no

major changes in iBAT weight were detected (Supplementary Fig.2). Cold-deacclimation caused the inactivation of the thermogenic program of gene expression, with a dramatic and sustained decrease in the mRNA relative expression levels of UCP1, PGC1 $\alpha$ , FGF21 and BMP8b (Fig6.B). Conversely, Parkin mRNA expression levels were induced after 1 day of deacclimation and remained high after 7 days at thermoneutrality. We also analyzed the mRNA expression levels of PINK1, the kinase responsible for the recruitment of Parkin to mitochondria. PINK1 mRNA expression levels showed a non-significant trend to increase after 1 day of deacclimation which reached statistical significance after 7 days of deacclimation (Fig6.B). (However, PINK1 is predominantly regulated in a post-translational manner. Once synthesized, PINK1 is imported to the mitochondria where can be cleaved and degraded, or stabilized in the mitochondrial surface to initiate mitophagy. PINK1 and Parkin protein levels were strongly induced after 7 days of deacclimation but only mildly after 1 day of deacclimation. (Fig6.C). For assessing autophagic activity in this context we used LC3B-II, a marker of autophagosomes, together with p62, an autophagic substrate that is degraded together with targeted protein aggregates and mitochondria and, therefore, is used as autophagic activity marker. After 1 day of deacclimation, we detected increased protein levels of LC3B-II, indicative of induced autophagy, that were maintained after 7 days of deacclimation. p62 levels were reduced after 7 days of deacclimation but not after 1 day (Fig6.C).

Electron microscopy images of iBAT from 1 day cold-deacclimated mice revealed the presence of mitochondria with few, unstructured cristae, and multiple double-membrane structures consistent with autophagosomes, some of them containing mitochondrial cristae residues inside (Fig6.D). This autophagosome accumulation is consistent with the increase of LC3B-II protein detected in iBAT from 1 day deacclimated mice, and may be a consequence of a massive autophagy activation



that overloads the degradative capacity of the cells. The analysis of electron microscopy images of iBAT from 1 day cold-deacclimated mice also revealed the presence of membrane vesicles emerging from mitochondria consistent with mitochondria derived vesicles (MDVs), a recently described mechanism associated with PINK1 and Parkin activity for degrading mitochondrial substrates (Fig6.D). This is consistent with a wide induction of autophagic activity in iBAT after 7 days of deacclimation to cold, specifically in the case of mitophagy, displayed by PINK1 stabilization, Parkin induction, and the degradation of p62. UCP1 protein levels decreased rapidly after 1 day of deacclimation, remaining stable after 7 days at thermoneutrality (Fig6.C).

Surprisingly, PINK1 protein was also stabilized during thermogenic activation in 1 day cold-acclimated mice, in a context of low Parkin protein expression levels, p62 accumulation and low autophagic activity (Fig6.C).

## DISCUSSION

Obesity has been described as a condition associated with reduced BAT activity. Thus, the identification of the regulatory mechanisms controlling BAT activation as well as the mechanisms preventing BAT inactivation may provide key therapeutic targets in obesity and the associated diseases. The present study points out to Parkin as a negative regulator of BAT thermogenic activity, involved in the degradation of mitochondria by autophagy during BAT inactivation. We also report that Parkin expression is repressed during BAT thermogenic activation, a transcriptional mechanism controlled by free fatty acids related pathways. Our data support the possibility that Parkin downregulation may be a compensatory mechanism to prevent PINK1-induced mitophagy. We report for the first time that PINK1 stabilization is a phenomenon that occurs during thermogenic activation, probably in response to the mitochondrial depolarization occurring during thermogenic activation through the action of UCP1. PINK1 stabilization may also be part of the mechanisms promoting mitochondrial fragmentation. During thermogenic activation, mitochondrial fragmentation act as a mechanism that enhances FFA oxidation and increases the thermogenic capacity of BAT [28]. It has been described as PINK1 can phosphorylate Mitofusin 2, disabling its capacity to promote mitochondrial fusion and serving as an amplifier mechanism to recruit Parkin [29]. Thus, in this “mitophagy-friendly” context, Parkin downregulation may protect targeted mitochondria from autophagic degradation. Lately, PINK1 downregulation together with its rapid turnover can explain the restore, at least, partially, of Parkin levels.

In accordance with our previously findings, Parkin repression was accompanied with the repression of general autophagy (macroautophagy) and p62 accumulation [30].

It has been reported that p62 seems to have an important role in BAT activity, probably through transcriptionally mechanisms unrelated to mitophagy [31]. Thus, p62 effects on thermogenesis regardless of its strict role in autophagy cannot be ruled out.

Regardless of the role of PINK1-Parkin system during thermogenic activation, the acquisition of the mechanisms for mitochondrial quality control may play an important role during brown adipocytes differentiation. Moreover, it has been reported that Parkin can influence mitochondrial biogenesis in neurons, through the ubiquitylation of PARIS, a negative regulator of PGC1 $\alpha$  [32, 33]. Here we found that Parkin expression is associated with brown adipocytes differentiation, in parallel with the induction of mitochondrial biogenesis and the expression of UCP1. This is in accordance with previous reports describing the differential role of autophagy during BAT development and adipogenesis compared to its role in mature brown adipocytes and in BAT during adulthood [21].

The analysis of mitophagy under physiological conditions relies in electron microscopy analysis and indirect assessments of mitochondrial protein lost. Using cellular models, we have previously reported that LCB can be colocalized with mitochondria in brown adipocytes in culture, and blocking lysosomal degradation increases both UCP1 content and uncoupled respiration [22]. However, the specific role of Parkin and mitophagy remained unexplored, the lack of reliable antibodies precluded a precise assessment in cell culture. Using cold-deacclimation as an *in vivo* model of BAT inactivation with mitochondrial protein lost [6], we could determine that PINK1 and Parkin-mediated mitophagy was involved in the whitening of BAT. We also detected events consistent with MDV, a system for degrading mitochondrial proteins involving

PINK1-Parkin system that allows the cells to select mitochondrial proteins for elimination [34-36]. Further research needs to be done to confirm this fact.

The importance of Parkin and mitophagy regulation for BAT activity can be expanded to the other thermogenically competent tissue, subcutaneous beige adipose tissue. In accordance with our findings regarding Parkin regulation in BAT, it has been recently described that mitophagy is part of the processes that mediates the reacquisition of the “white” phenotype to beige adipose tissue [24]. In this work, Altshuler-Keylin and collaborators described how autophagy acts as a negative regulator of thermogenic activity by eliminating the oxidative machinery by mitophagy. Although this study did not analyze the involvement of PINK1-Parkin system in beige-to-white transition, another recent study has described that Parkin is downregulated in beige subcutaneous fat during thermogenic activation, with no effects in epididymal WAT [37].

The involvement of FFA-related pathways in the transcriptional control of Parkin gene has been previously described for other autophagic genes in the liver. In this case PPAR $\alpha$ , in coordination with the cAMP-CREB pathway, can target some autophagy-related genes and activate its transcription in response to fasting [38, 39]. Here we describe that the lipolysis-derived FFA during thermogenic activation are essential for Parkin downregulation. Moreover, activating PPAR $\alpha$  but not other catecholamine-independent thermogenic activators (such as all-trans-retinoic acid), was enough to promote Parkin downregulation. Even we did not find evidences of the involvement of PKA and p38MAPK pathways in Parkin transcriptional downregulation. Thus indicating a relevant role of fatty acid mediated mechanism in Parkin regulation in BAT.

Consistent with the *in vitro* data, we observed that Parkin-KO mice showed increased BAT activity, with increased UCP1 expression and heat production. We also observed enhanced mRNA expression of several thermogenic genes. Moreover, FGF21 and IL6 were over-induced in Parkin-KO mice in response to cold. FGF21 and IL6 are secreted factors involved in the autocrine and endocrine role BAT [40]. Their involvement in Parkin-KO mice phenotype would deserve further investigation. Consistent with the protective role of thermogenesis against obesity and insulin resistance, Parkin-KO mice were protected against body weight increases and insulin resistance when fed with HFD and, in fact, there was enhanced expression of some thermogenic genes in BAT from Parkin-KO mice fed with HFD. This BAT over-activity was translated in a lower adiposity, especially in the case of brown and beige subcutaneous fat. This was consistent with previous reports describing a protective role of the lack of Parkin against obesity [41]. Kim et al. identified Parkin as a regulator of the lipid transporter CD36, mediating its stabilization, and influencing lipid uptake in hepatocytes and in white adipocytes during differentiation. We took advantage to the fact that BAT is the main tissue responsible of the plasma triglyceride clearance occurring in response to cold [42] to assess BAT triglycerides uptake. We do not detect any differences between wild type and Parkin-KO mice (data not shown), so we assumed that the reduced lipid content detected in BAT of Parkin-KO mice was a consequence of BAT thermogenic activity.

## **CONCLUSIONS**

In conclusion, autophagy and especially mitophagy are processes associated negatively with BAT thermogenic activation. Parkin, acting downstream of PINK1,

appear to be a key regulatory point for mitophagy in BAT, and parkin downregulation is identified as a major component of the acquisition of a BAT activated phenotype. Parkin repression during thermogenic activation may serve as a protective mechanism for preserving depolarized mitochondria, while Parkin induction promotes mitophagy during BAT inactivation. Mice devoid of Parkin have overactive BAT and are protected against HFD-induced obesity and insulin resistance.

## REFERENCES

1. Ricquier, D. and F. Bouillaud, *Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance*. J Physiol, 2000. **529 Pt 1**: p. 3-10.
2. Feldmann, H.M., et al., *UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality*. Cell Metab, 2009. **9**(2): p. 203-9.
3. Lowell, B.B., et al., *Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue*. Nature, 1993. **366**(6457): p. 740-2.
4. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 277-359.
5. Golozoubova, V., et al., *Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold*. FASEB J, 2001. **15**(11): p. 2048-50.
6. Gospodarska, E., P. Nowialis, and L.P. Kozak, *Mitochondrial turnover: a phenotype distinguishing brown adipocytes from interscapular brown adipose tissue and white adipose tissue*. J Biol Chem, 2015. **290**(13): p. 8243-55.
7. Harms, M. and P. Seale, *Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1252-63.
8. Shabalina, I.G., et al., *UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic*. Cell Rep, 2013. **5**(5): p. 1196-203.
9. Giralt, M. and F. Villarroya, *White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?* Endocrinology, 2013. **154**(9): p. 2992-3000.
10. Bento, C.F., et al., *Mammalian Autophagy: How Does It Work?* Annu Rev Biochem, 2016. **85**: p. 685-713.

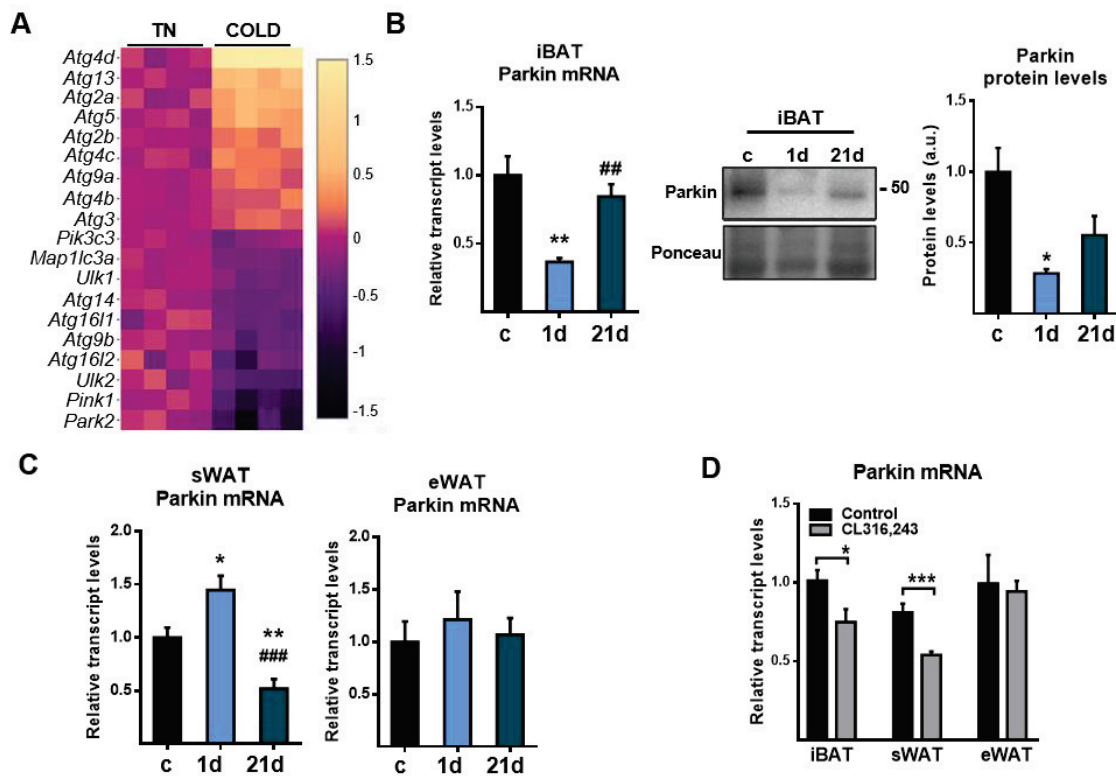
11. Kaur, J. and J. Debnath, *Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(8): p. 461-72.
12. Singh, R. and A.M. Cuervo, *Autophagy in the cellular energetic balance*. Cell Metab, 2011. **13**(5): p. 495-504.
13. Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, and J.J. Lemasters, *Selective degradation of mitochondria by mitophagy*. Arch Biochem Biophys, 2007. **462**(2): p. 245-53.
14. Ashrafi, G. and T.L. Schwarz, *The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria*. Cell Death Differ, 2013. **20**(1): p. 31-42.
15. Bingol, B. and M. Sheng, *Mechanisms of mitophagy: PINK1, Parkin, USP30 and beyond*. Free Radic Biol Med, 2016. **100**: p. 210-222.
16. Matsuda, N., et al., *PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy*. J Cell Biol, 2010. **189**(2): p. 211-21.
17. Narendra, D.P., et al., *PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin*. PLoS Biol, 2010. **8**(1): p. e1000298.
18. Baerga, R., et al., *Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice*. Autophagy, 2009. **5**(8): p. 1118-30.
19. Singh, R., et al., *Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(11): p. 3329-39.
20. Zhang, Y., et al., *Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(47): p. 19860-5.
21. Martinez-Lopez, N., et al., *Autophagy in Myf5+ progenitors regulates energy and glucose homeostasis through control of brown fat and skeletal muscle development*. EMBO Rep, 2013. **14**(9): p. 795-803.



22. Cairo, M., et al., *Thermogenic activation represses autophagy in brown adipose tissue*. Int J Obes (Lond), 2016. **40**(10): p. 1591-1599.
23. Martinez-Lopez, N., et al., *Autophagy in the CNS and Periphery Coordinate Lipophagy and Lipolysis in the Brown Adipose Tissue and Liver*. Cell Metab, 2016. **23**(1): p. 113-27.
24. Altshuler-Keylin, S., et al., *Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance*. Cell Metab, 2016. **24**(3): p. 402-19.
25. Quesada-Lopez, T., et al., *The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13479.
26. Tran, T.A., et al., *Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor regulate Parkin expression via nuclear factor-kappa B*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23660.
27. Rosell, M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and -gamma, and cAMP-mediated pathways, control retinol-binding protein-4 gene expression in brown adipose tissue*. Endocrinology, 2012. **153**(3): p. 1162-73.
28. Wikstrom, J.D., et al., *Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure*. EMBO J, 2014. **33**(5): p. 418-36.
29. Chen, Y. and G.W. Dorn, 2nd, *PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria*. Science, 2013. **340**(6131): p. 471-5.
30. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)*. Autophagy, 2016. **12**(1): p. 1-222.
31. Muller, T.D., et al., *p62 links beta-adrenergic input to mitochondrial function and thermogenesis*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 469-78.

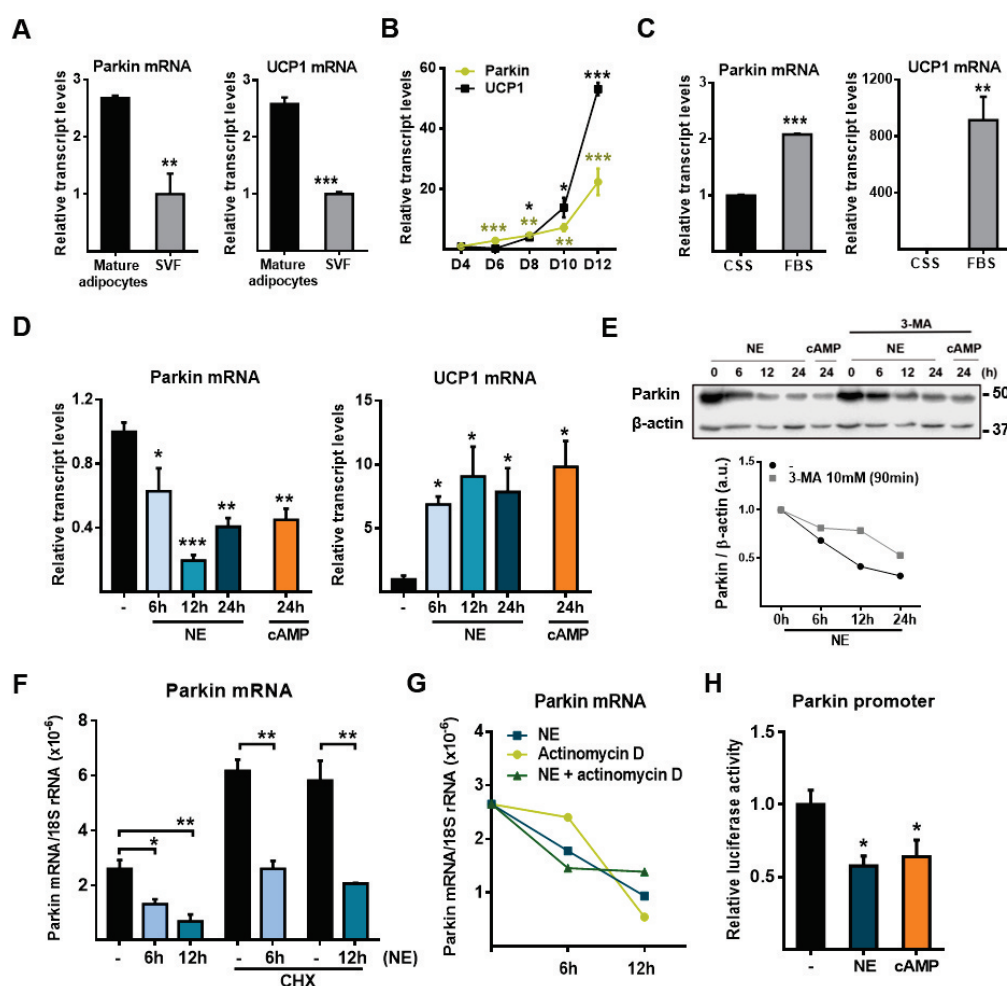
32. Castillo-Quan, J.I., *Parkin' control: regulation of PGC-1alpha through PARIS in Parkinson's disease*. Dis Model Mech, 2011. **4**(4): p. 427-9.
33. Shin, J.H., et al., *PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease*. Cell, 2011. **144**(5): p. 689-702.
34. McLelland, G.L., et al., *Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control*. EMBO J, 2014. **33**(4): p. 282-95.
35. Sugiura, A., et al., *A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles*. EMBO J, 2014. **33**(19): p. 2142-56.
36. McLelland, G.L., et al., *Syntaxin-17 delivers PINK1/parkin-dependent mitochondrial vesicles to the endolysosomal system*. J Cell Biol, 2016. **214**(3): p. 275-91.
37. Taylor, D. and R.A. Gottlieb, *Parkin-mediated mitophagy is downregulated in browning of white adipose tissue*. Obesity (Silver Spring), 2017. **25**(4): p. 704-712.
38. Lee, J.M., et al., *Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy*. Nature, 2014. **516**(7529): p. 112-5.
39. Seok, S., et al., *Transcriptional regulation of autophagy by an FXR-CREB axis*. Nature, 2014. **516**(7529): p. 108-11.
40. Villarroya, F., et al., *Brown adipose tissue as a secretory organ*. Nat Rev Endocrinol, 2017. **13**(1): p. 26-35.
41. Kim, K.Y., et al., *Parkin is a lipid-responsive regulator of fat uptake in mice and mutant human cells*. J Clin Invest, 2011. **121**(9): p. 3701-12.
42. Bartelt, A., et al., *Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance*. Nat Med, 2011. **17**(2): p. 200-5.

**Figure 1.**



**Figure 1. Parkin expression is repressed by thermogenic stimuli in brown and beige adipose tissue.** (A) Profile of transcript levels of autophagy-related genes in iBAT which are significantly modified ( $p<0.05$ ) in cold exposed mice (4°C, 24h), compared with mice maintained at thermoneutral temperature (29°C). Heatmap represents log fold change of RPKM values of cold versus thermoneutral (TN) sample data from RNAseq analysis. Each square represents replicates ( $n=4$ ). The most repressed genes are shown on the bottom of the heatmap. (B) Parkin relative transcript levels (left) and Parkin protein levels (right) in iBAT from mice exposed to cold (4°C) for 1 day (1d) or 21 days (21d) compared with control mice (c) maintained at 22°C. Representative Parkin protein immunoblot and loading control (Ponceau staining) are shown (middle). (C) Parkin relative transcript levels in sWAT and eWAT of control, 1 day, and 21 days cold exposed mice. (D) Parkin relative transcript levels in iBAT, sWAT and eWAT of mice injected daily with the  $\beta$ 3-AR agonist CL316,243 during one week. The bars represent means  $\pm$ s.e.m ( $n=6$ ). Analysis of variance with Tukey's post hoc test was used in B and C (\*\* $p<0.01$ , cold vs control; ## $p<0.01$ , ### $p<0.001$ , between cold conditions), and two-tailed unpaired Student's t-test was performed in D (\* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$ ; treated with CL316243 vs saline).

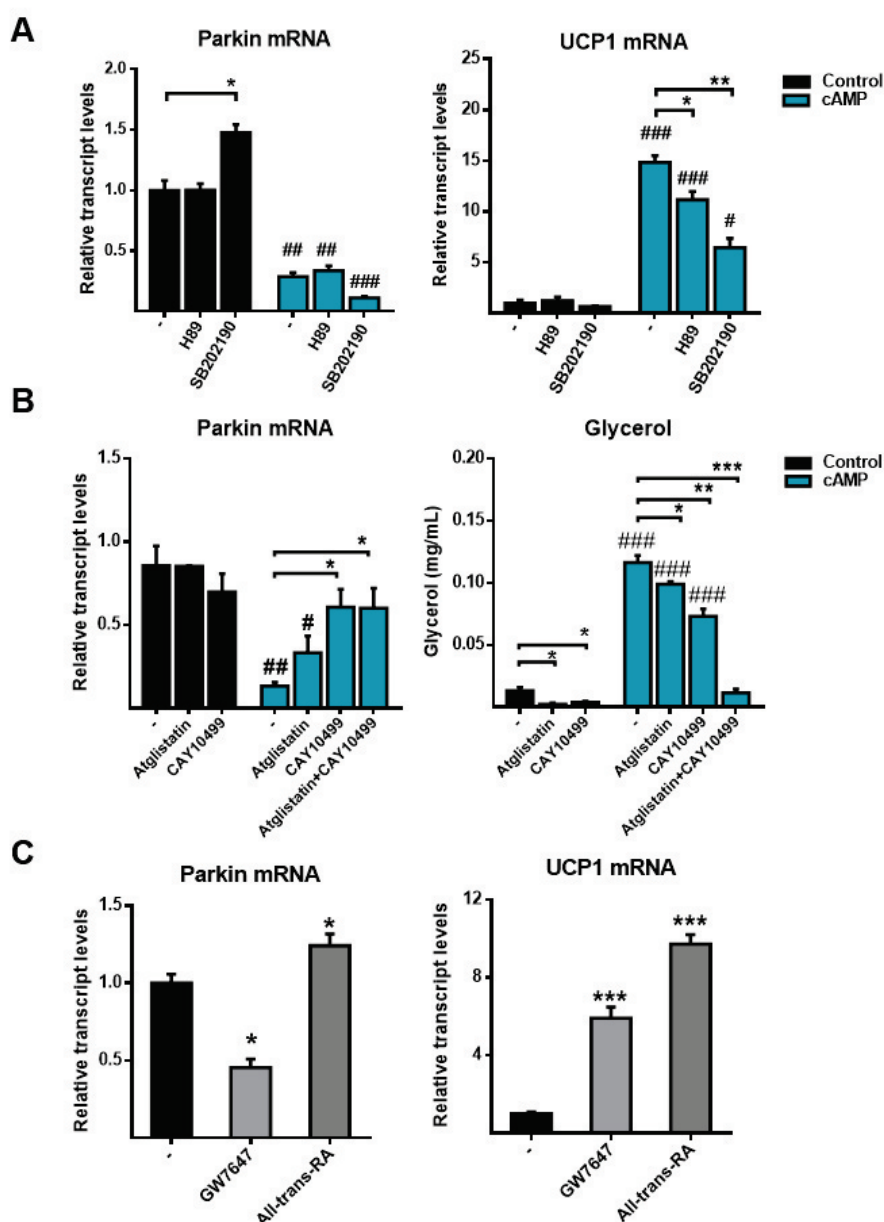
**Figure 2.**



**Figure 2. Parkin expression is induced during brown adipocyte differentiation but repressed during norepinephrine-induced, cAMP-mediated, thermogenic activation.** (A) Relative transcript levels of Parkin and UCP1 in mature brown adipocytes compared with the stroma vascular fraction (SVF) in iBAT (n=3). For B to G Parkin expression was assessed in primary brown adipocytes in culture (B) Parkin and UCP1 mRNA expression profile during differentiation (n=3). (C) Parkin and UCP1 relative transcript levels in brown adipocytes in culture differentiated in the presence of fetal bovine serum (FBS) or charcoal-stripped serum (CSS), non-permissive for differentiation (n=3). (D) Parkin and UCP1 relative transcript levels in brown adipocytes in culture treated with norepinephrine (NE) or cAMP for indicated times (n=3). (E) Parkin protein levels in brown adipocytes treated with NE or cAMP in the presence or absence of the macroautophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) for indicated times. Representative Parkin immunoblot and loading control ( $\beta$ -actin) are shown. (F) Relative mRNA expression levels of Parkin in response to NE in the presence or absence of cycloheximide (CHX) (n=3). Relative mRNA expression levels of Parkin in response to NE in the presence or absence of actinomycin D (n=3). (H) Parkin gene (*Park2*) promoter activity in HIB-1B cells transfected with a pGL4-*Park2*-Luc reporter construct treated with or without NE or cAMP. Data was normalized using Renilla luciferase activity and expressed as the relative firefly luciferase activity compared

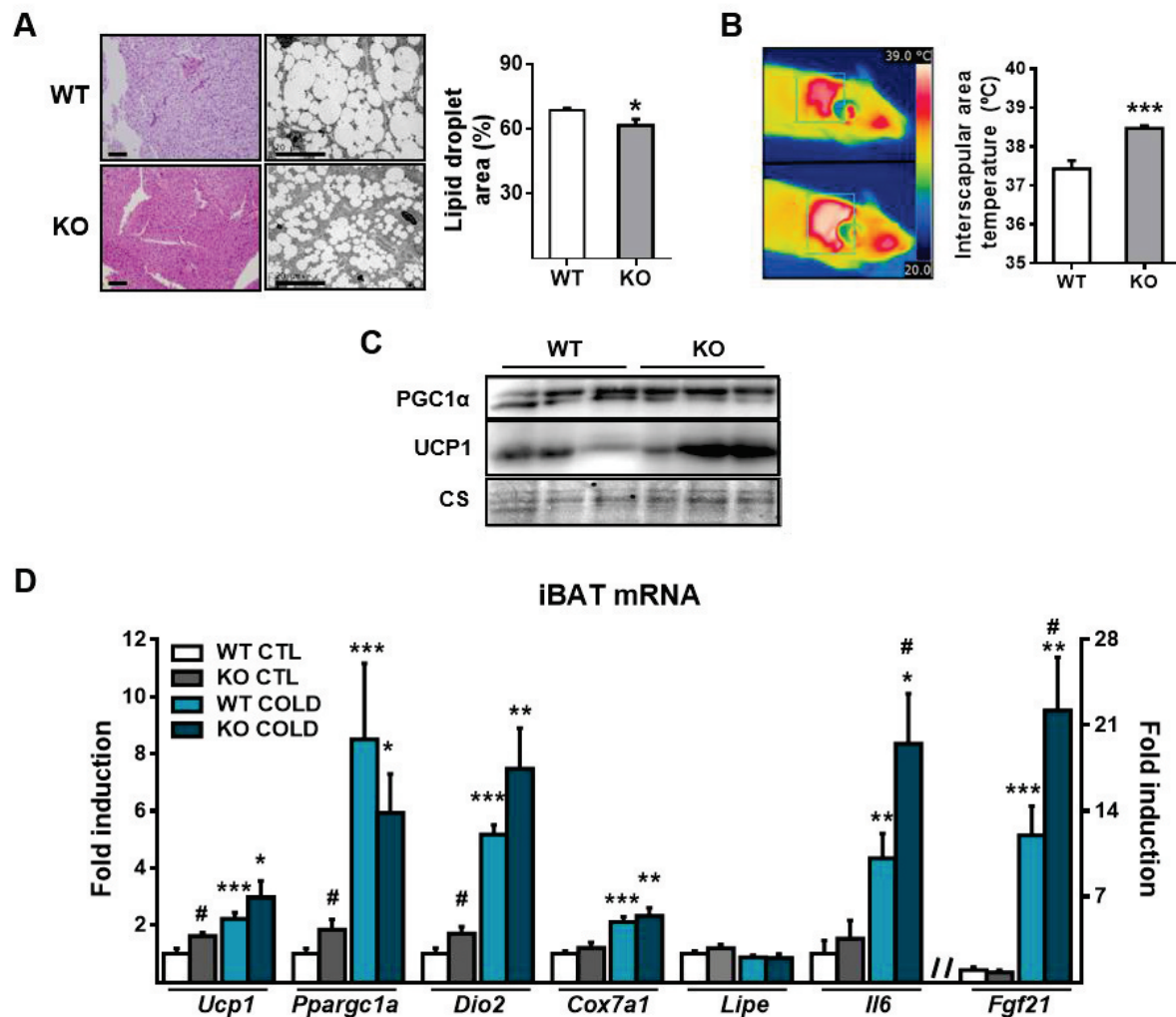
to untreated cells (n=6). The bars represent means  $\pm$ s.e.m. Two-tailed unpaired Student's *t*-test was performed in A, B, C and G (\**p*<0.05, \*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0.001, \*\*\*\**p*<0.0001). Analysis of variance with Dunnett's *post hoc* test was used in D and H (\**p*<0.05, \*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0.001).

**Figure 3.**



**Figure 3. cAMP-mediated downregulation of Parkin is dependent on lipolysis activity.** (A) Relative transcript levels of Parkin and UCP1 in brown adipocytes in culture treated with cAMP (12h) and with H89 (protein kinase-A inhibitor) or SB202190 (p38 mitogen-activator kinase inhibitor) (n=3). (B) Relative transcript levels of Parkin, and glycerol concentration in the culture media (as indicative of lipolysis) in brown adipocytes in culture treated with cAMP (24h) and with Atglistatin (adipose triglyceride lipase inhibitor) or CAY10499 (hormone sensitive lipase inhibitor) (n=3). (C) Relative transcript levels of Parkin and UCP1 in brown adipocytes in culture treated 24h with GW7647 (PPAR $\alpha$  agonist) or all-*trans*-retinoic acid (RA) (n=3). The bars represent means  $\pm$  s.e.m. Two-tailed unpaired Student's t-test was performed (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 treated vs non-treated with inhibitor/agonist; #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001 control vs cAMP).

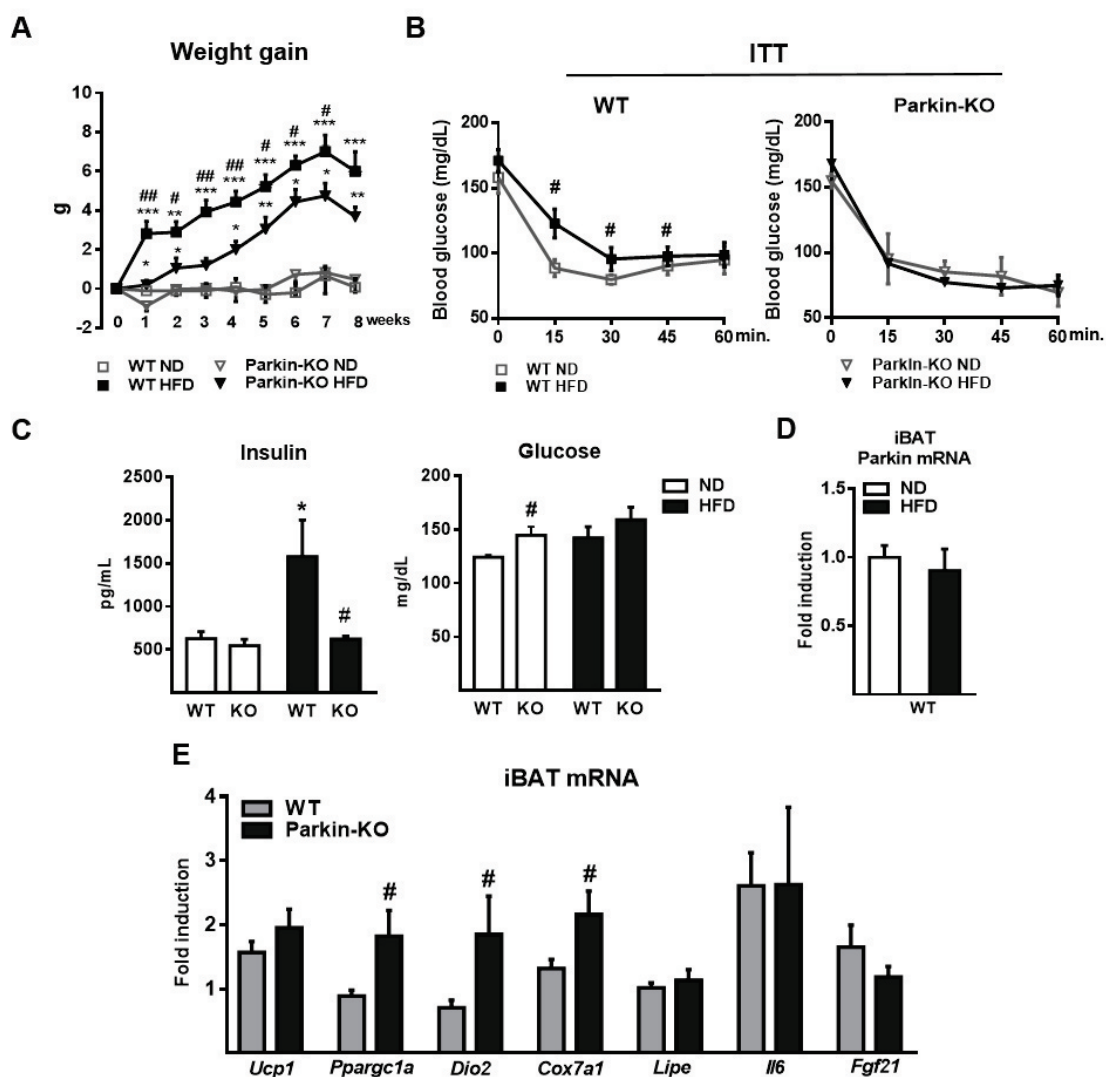
**Figure 4.**



**Figure 4. Parkin-KO mice show over-activated BAT.** (A) *Left*: representative optical microscopy images of H&E-stained iBAT (scale bar 110μm) and electron microscopy images of iBAT (scale bar 20nm) from WT and Parkin-KO mice. *Right*: quantification of lipid droplet area from electron microscopy images (a minimum of 10 images per condition were used). (B) Representative thermal images (left) and quantification of surface temperature (right) of the interscapular region of WT and Parkin-KO mice (n=6). (C) Representative immunoblot of PGC1α and UCP1 protein and loading control (Coomassie staining) in iBAT samples from WT and Parkin-KO mice. (D) Relative transcript levels of thermogenic-related genes of iBAT from WT and Parkin-KO mice exposed to acute cold (24 hrs, 4°C) compared to control temperature (22°C) (n=6-8). The bars represent means ±s.e.m. Two-tailed unpaired Student's *t*-test was performed. (\**p*<0.05, \*\*\**p*<0.001 in A and B), (#*p*<0.05, WT vs Parkin-KO; \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001, CTL vs cold, in D).

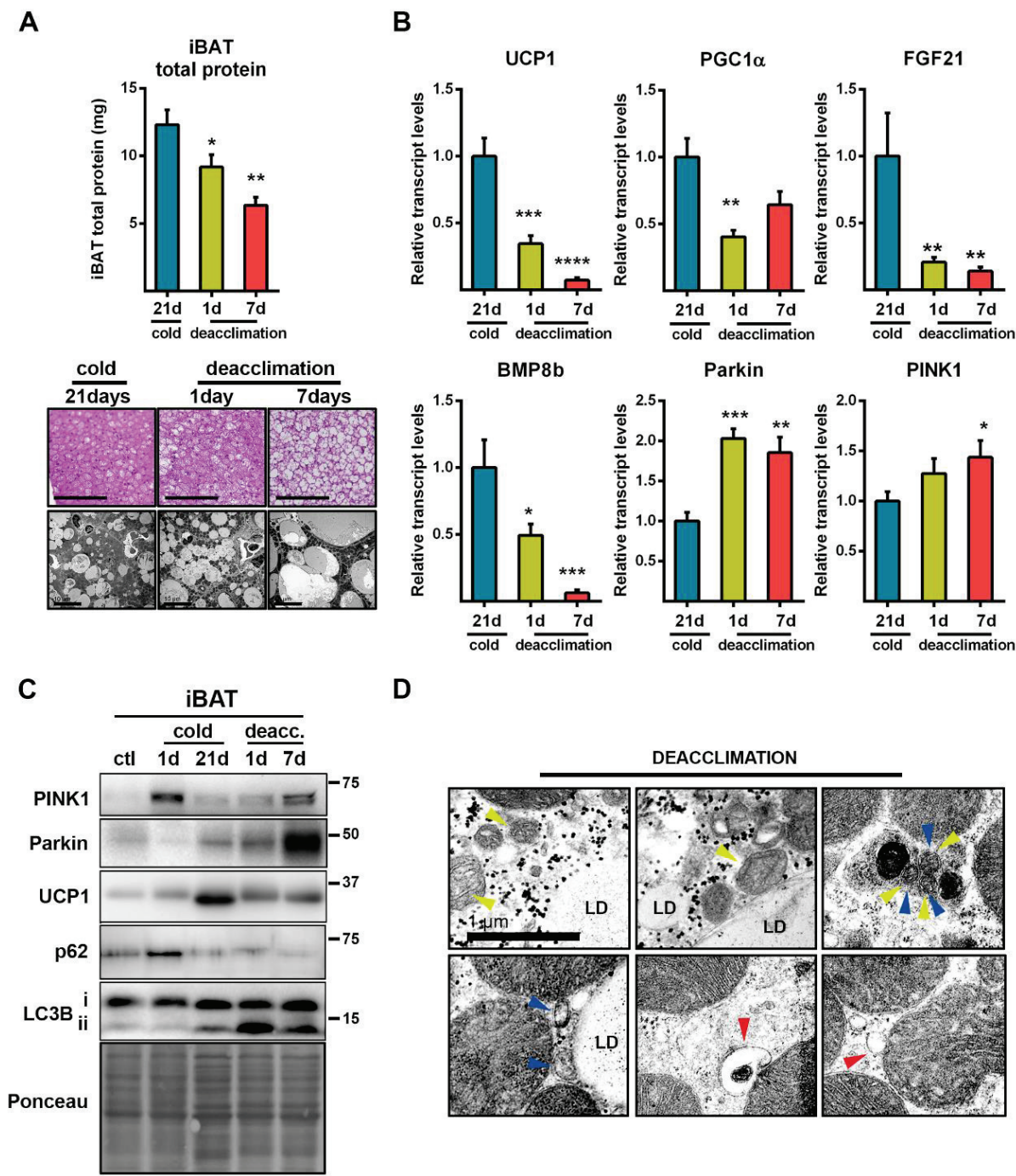


**Figure 5.**



**Figure 5. Parkin-KO mice are protected against HFD-induced gain weight and insulin resistance.** WT and Parkin-KO mice were fed with normal (ND) or high fat diet (HFD) for 8 weeks (n=6-8). (A) Weight gain (B) Insulin tolerance test (ITT) from WT (left) and Parkin-KO (right) mice after 7 weeks of HFD diet. (C) Plasma insulin and blood glucose levels. (D) Parkin mRNA levels in iBAT from WT mice in response to HFD. (E) Relative transcript levels of thermogenic-related genes in iBAT from WT and Parkin-KO mice fed with HFD. Data are presented as means  $\pm$  s.e.m. Two-tailed unpaired Student's *t*-test was performed (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ND vs HFD; # $p < 0.05$ , ##  $p < 0.05$  WT vs Parkin-KO).

Figure 6.



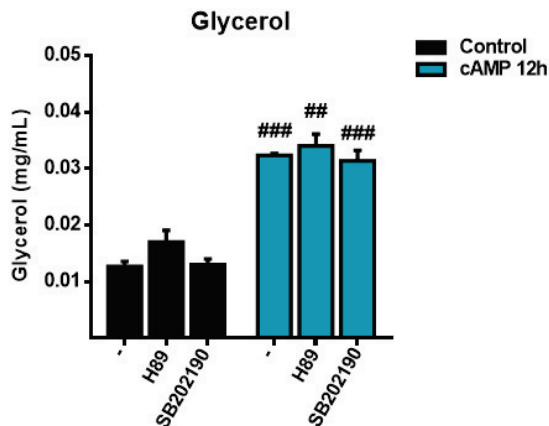
**Figure 6. Deacclimation to cold induces dramatically Parkin expression and autophagic degradation of mitochondria.** WT mice were acclimated to cold for 21 days (21d, 4°C) and then deacclimated at thermoneutrality (29°C) for 1 day (1d) or 7 days (7d) (n=6). (A) *Top*: total amount of iBAT protein during cold deacclimation. *Bottom*: representative optical microscopy images of H&E-stained iBAT (scale bar 100µm) and electron microscopy images of iBAT (scale bar 10µm). (B) mRNA expression profile of thermogenic- and mitophagy-related genes in iBAT. (C) Representative immunoblot of the indicated thermogenic and autophagic proteins during cold acclimation and deacclimation in iBAT. (D) Representative electron microscopy images of autophagic and mitophagic events in iBAT after 1 day of cold deacclimation. Yellow arrowheads indicate mitochondria cristae, blue arrowheads indicate double-membrane autophagosomes, and red arrowheads indicate structures compatible with mitochondria derived vesicles. Data are presented as means ±s.e.m. Analysis of variance with Dunnett's *post hoc* test (\*p<0.05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0.001).

**Table 1. Morphometric parameters, tissue weight and circulating levels of metabolites and adipokines in WT and Parkin-KO mice under normal and high fat diet.**

	ND		HFD	
	WT	Parkin-KO	WT	Parkin-KO
Body weight (g)	28,6 ± 0,7	<b>25,6 ± 0,4 #</b>	<b>34,0 ± 1,4**</b>	<b>29,2 ± 0,9***#</b>
Food intake (kcal/day)	10,8 ± 0,2	<b>9,78 ± 0,2#</b>	<b>13,9 ± 2,8**</b>	<b>12,7 ± 0,4**</b>
eWAT (mg)	543 ± 64	453 ± 59	<b>1482 ± 241**</b>	<b>928 ± 87**</b>
sWAT (mg)	343 ± 39	309 ± 25	<b>794 ± 92**</b>	<b>460 ± 88#</b>
iBAT (mg)	89,6 ± 4,2	<b>60,6 ± 2,9##</b>	<b>133 ± 10**</b>	<b>73,5 ± 5,2##</b>
Liver (mg)	1346 ± 43	<b>1096 ± 45#</b>	1367 ± 70	<b>1040 ± 65#</b>
Triglycerides (mg/dL)	238 ± 12	208 ± 15	<b>169 ± 10 *</b>	195 ± 32
NEFA (mmol/mL)	1,58 ± 0,2	1,64 ± 0,3	1,70 ± 0,4	1,67 ± 0,3
Ketone bodies (μmol/L)	193 ± 28	242 ± 42	176 ± 12	226 ± 26
FGF21 (pg/mL)	312 ± 64	457 ± 40	712 ± 127	574 ± 99
Leptin (pg/mL)	1495 ± 372	849 ± 116	<b>6062 ± 1369 **</b>	<b>3515 ± 729*</b>
Resistin (pg/mL)	726 ± 109	929 ± 125,0	877 ± 182	734 ± 47
IL-6 (pg/mL)	9,1 ± 0,2	8,4 ± 0,3	8,7 ± 0,4	9,7 ± 0,3
PAI-I (pg/mL)	781 ± 115	874 ± 180	887 ± 160	1067 ± 204

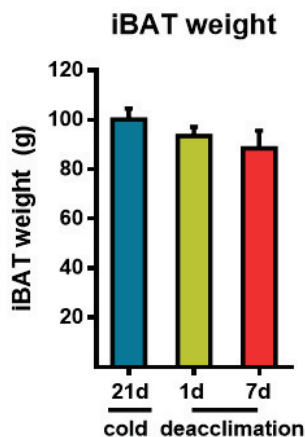
Data are means ±s.e.m. Two-tailed unpaired Student's *t*-test was performed (#*p*<0.05, ##*p*<0,01 WT vs Parkin-KO; \**p*<0.05, \*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0.001, ND vs HFD). ND: normal diet; HFD: high fat diet; eWAT: epididymal white adipose tissue; sWAT: subcutaneous white adipose tissue; iBAT: interscapular brown adipose tissue; NEFA: non-esterified fatty acids; FGF21: Fibroblast growth factor 21; IL-6: Interleukin 6; PAI-I: Plasminogen activator inhibitor-1.

### Supplementary Figure 1.



**Supplementary Figure 1.** Glycerol concentration in the culture media (as indicative of lipolysis) of brown adipocytes treated with cAMP and with H89 (protein kinase-A inhibitor) or SB202190 (p38 mitogen-activator kinase inhibitor) (n=3). The bars represent means  $\pm$ s.e.m. Two-tailed unpaired Student's t-test was performed (###p<0.01, ###p<0.001 control vs cAMP).

### Supplementary Figure 2.



**Supplementary Figure 2.** Interscapular brown adipose tissue (iBAT) weight from wild-type mice acclimated to cold for 21 days (21d, 4°C) and then deacclimated at thermoneutrality (29°C) for 1 day (1d) and for 7 days (7d) (n=6). The bars represent means  $\pm$ s.e.m. Analysis of variance with Dunnett's post hoc test was performed.

**Supplementary Table 1. Taqman gene expression assays**

<b>Gene name</b>	<b>Catalogue number</b>
<i>Park2</i>	Mm_00450187_m1
<i>Pink1</i>	Mm_00550827_m1
<i>Ucp1</i>	Mm00494069_m1
<i>Ppargc1a</i>	Mm00447183_m1
<i>Dio2</i>	Mm0055664_m1
<i>Cox7a1</i>	Mm_00438296_m1
<i>Lipe</i>	Mm_00495359_m1
<i>Il6</i>	Mm_00446191_m1
<i>Fgf21</i>	Mm_00840165_m1
<i>Bmp8b</i>	Mm_00432115_g1
<i>Acadm/Mcad</i>	Mm_00431611_m1
<i>Hmgacs2</i>	Mm_00550050_m1
<i>Scd1</i>	Mm00772290_m1
<i>Ehhadh</i>	Mm_00619688_m1
<i>G6pc3</i>	Mm_00450187_m1
<i>Pck1</i>	Mm_00440636_m1
<i>Ppara</i>	Mm_00440939_m1
<i>18s rRNA</i>	Hs99999901_s1

**Supplementary Table 2. mRNA relative expression levels of genes related to energy metabolism in liver from WT and Parkin-KO mice under normal and high fat diet.**

	ND		HFD	
	WT	KO	WT	KO
MCad ( $\times 10^{-3}$ )	1,55 $\pm$ 0,2	1,78 $\pm$ 0,2	2,08 $\pm$ 0,3	2,43 $\pm$ 0,3
Hmgacs2 ( $\times 10^{-4}$ )	1,27 $\pm$ 0,1	1,78 $\pm$ 0,1	1,52 $\pm$ 0,1	1,50 $\pm$ 0,2*
Scd1 ( $\times 10^{-3}$ )	7,87 $\pm$ 1,5	12,0 $\pm$ 2,7	10,5 $\pm$ 2,4	7,22 $\pm$ 1,1
Ehhadh ( $\times 10^{-4}$ )	1,73 $\pm$ 0,3	1,29 $\pm$ 0,2	1,55 $\pm$ 0,2	1,43 $\pm$ 0,2
G6pc3 ( $\times 10^{-6}$ )	3,33 $\pm$ 0,5	3,21 $\pm$ 0,5	3,18 $\pm$ 0,3	3,71 $\pm$ 0,7
Pck1 ( $\times 10^{-4}$ )	4,02 $\pm$ 0,5	5,59 $\pm$ 0,4	2,67 $\pm$ 0,4	4,83 $\pm$ 1,1
Ppara ( $\times 10^{-5}$ )	5,98 $\pm$ 0,6	5,31 $\pm$ 0,4	7,67 $\pm$ 0,7	9,52 $\pm$ 1,3*
Fgf21 ( $\times 10^{-6}$ )	4,44 $\pm$ 0,8	3,31 $\pm$ 0,8	7,88 $\pm$ 0,2	6,80 $\pm$ 0,1

Data are means  $\pm$ s.e.m, and are expressed relative to the expression of the 18S rRNA gene. Two-tailed unpaired Student's *t*-test was performed (#*p*<0.05, ##*p*<0,01 WT vs Parkin-KO; \**p*<0.05, \*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0.001, ND vs HFD). ND: normal diet; HFD: high fat diet.



## **Hormonal and nutritional signalling in the control of brown and beige adipose tissue activation and recruitment**

**Revista:** Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism

**PMID:** 27697212

**Títol:** Senyalització hormonal i nutricional en el control de l'activació i el reclutament del teixit adipós marró i beix

### **Resum:**

Estudis recents han descrit com l'activitat del teixit adipós marró (TAM) en els humans adults és superior al que tradicionalment s'havia pensat, i com els pacient obesos presenten nivells d'activitat del TAM anormalment baixos. D'altres estudis realitzats amb animals d'experimentació han mostrat com el TAM és un lloc de despesa energètica, l'activitat del qual protegeix envers la obesitat i les malalties metabòliques associades. L'acció del sistema nerviós simpàtic en els dipòsits de TAM es considera el principal regulador de l'activitat del TAM en models murins, i possiblement també en humans. Tot i així, estudis recents han revelat l'existència de factors hormonals addicionals, produïts per diferents teixits perifèrics o presents en la dieta, els quals influencien l'activitat del TAM. Aquest factors hormonals poden actuar sobre el TAM de manera directa però també de manera indirecta, a través d'accions en el cervell i determinant la intensitat de l'acció simpàtica sobre el TAM. La identificació i caracterització de nous factors en el control del TAM, pot proporcionar les claus per al desenvolupament de noves estratègies per el tractament de l'obesitat i les malalties metabòliques.

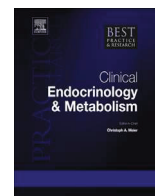




Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

## Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/beem](http://www.elsevier.com/locate/beem)



5

### Hormonal and nutritional signalling in the control of brown and beige adipose tissue activation and recruitment



Marta Giralt, PhD, Associate Professor <sup>a, b, c</sup>,  
Montserrat Cairó, MS, Researcher <sup>a, b, c</sup>,  
Francesc Villarroya, PhD, Professor <sup>a, b, c, \*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine and Institut de Biomedicina (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>b</sup> CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Spain

<sup>c</sup> Institut de Recerca Pediàtrica Sant Joan de Déu, Barcelona, Catalonia, Spain

#### A R T I C L E I N F O

##### Article history:

Available online 15 August 2016

##### Keywords:

brown adipose tissue  
beige adipose tissue  
obesity  
thermogenesis

Recent research has revealed that the activity of adipose tissue (BAT) in adult humans is higher than previously thought, and that obese patients show abnormally low levels of brown fat activity. Studies in experimental animals have shown that BAT is a site of energy expenditure, and that BAT activity protects against obesity and associated metabolic diseases. The action of the sympathetic nervous activity on BAT depots is considered the main regulator of BAT activity in rodent models and possibly also in humans. However, recent research has revealed the existence of additional hormonal factors, produced by distinct peripheral tissues or present in the diet, that influence the amount and activity of BAT. These hormonal factors may act on BAT directly, but also indirectly by targeting the brain and determining the intensity of sympathetic action upon BAT. Identification and characterization of novel factors that control BAT may provide clues for the development of new strategies to treat obesity and metabolic diseases.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 643, E-08028, Barcelona, Spain. Fax: +34 93-4021559.

E-mail address: [fvillarroya@ub.edu](mailto:fvillarroya@ub.edu) (F. Villarroya).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2016.08.005>

1521-690X/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### **Introduction: brown adipose tissue activity and protection against obesity and associated diseases**

Brown adipose tissue (BAT) has been recognized in recent decades as the main site of non-shivering thermogenesis. This physiological process reflects the oxidation of metabolic substrates to provide heat through mechanisms unrelated to the muscle contraction-associated energy expenditure provided by shivering. Brown adipocytes are a source of heat production, thanks to their naturally-uncoupled mitochondrial respiration, which translates the high oxidation rates of brown adipocytes in heat production instead of ATP synthesis. The specific expression of mitochondrial uncoupling protein-1 (UCP1) in brown adipocytes provides a unique proton permeability to the mitochondrial inner membrane of these cells that is essential for conferring this unique property on brown adipocyte mitochondria [1]. Experimental studies in rodents have shown that BAT activity protects against obesity by providing a mechanism for burning metabolic substrates and preventing excessive accumulation of fat [2,3]. Moreover, putative role of BAT as a sink for circulating metabolites makes BAT activation a potential protective mechanism for hyperglycaemia and hypertriglyceridemia [4,5]. Recent studies highlighting the plasticity of adipose tissues have added additional complexity to this scenario. It has been shown that sustained thermogenic activation of BAT leads not only to the activation of BAT itself, but also to the appearance of brown adipocyte-like cells in adipose tissue depots that usually contain only white (energy-storing) adipocytes [6]. This process is the so-called “browning” of white adipose tissue (WAT). The brown adipocyte-like cells, called beige or brite, contain UCP1 and also perform thermogenic, uncoupled respiration [7]. Although still controversial [8,9], some researchers consider the appearance and activity of these cells highly relevant to systemic energy expenditure [10] and some claim that they harbour specific energy expenditure mechanisms in addition to UCP1-mediated uncoupling of mitochondrial respiration [11].

The recent recognition of active BAT in adult humans has underscored the biomedical potential of BAT activation, recognized previously in experimental models, for management of diseases such as obesity, diabetes and dyslipidaemias. Multiple observations regarding BAT activity in humans, based on the use of positron emission tomography (PET)-scanning procedures, have confirmed previous observations in rodent models: specifically, the relevant role of sympathetic, noradrenergic-mediated, regulation of BAT activity, a progressive decline in BAT activity with ageing, and impaired BAT activity in obese patients [12]. Moreover, BAT in adult humans appears to be composed of cells arising from the “classical” brown adipocyte and of beige/brite adipocyte lineages [6].

### **The control of BAT activity: beyond noradrenergic regulation**

An understanding of the physiological regulators of BAT activation and browning of WAT, is of utmost relevance to the identification of potential targets for pharmacological or nutritional modulation of BAT activity so as to take advantage of the BAT activation-associated healthy metabolic profile. The major physiological regulator of BAT activity is sympathetic activity. Sympathetic nerve endings innervating BAT release noradrenaline, which acts on  $\beta$ -adrenergic receptors (mainly of the  $\beta$ -3 type) on the brown adipocyte cell surface to elicit a myriad of processes that contribute co-ordinately to thermogenic activation. These include acute induction of intracellular lipolysis, which releases fatty acids as a source for mitochondrial oxidation and activation of UCP1-mediated proton permeability; induction of the expression of the UCP1 gene and other genes related to the metabolic oxidative machinery; and induction of lipoprotein lipase activity to promote active uptake of fatty acids from circulating triglycerides to sustain oxidation [1]. Unfortunately, the therapeutic use of sympathomimetics to promote energy expenditure (and likely enhance BAT activity) has proved ineffective because of a lack of specificity and deleterious side-effects on the cardiovascular system [13]. A recent report claimed that  $\beta$ -3 adrenergic stimulation using the drug mirabegron, approved for use in humans for the treatment of overactive bladder, can activate BAT in healthy humans [14]; however, its therapeutic utility in obese or diabetic humans remains to be established. Similar to BAT activation and recruitment, noradrenergic regulation via  $\beta$ 3-adrenergic pathways induces the WAT browning process [15].

Several non-adrenergic regulators of BAT activity and recruitment, and of the WAT browning process, have been identified [16]. Recent years have witnessed a burst in the identification of novel regulators, possibly due to the growing interest in this type of research for its relevance to establishing alternatives to sympathetic stimulation for foreseeable therapeutic purposes related to BAT activation. The identification of non-sympathetic regulators of BAT is a complicated proposition. The signalling of multiple hormones and other agents, and their cross-talk with the central nervous system, often makes it difficult to establish whether a given hormone or signal directly influences BAT activity or acts indirectly by modulating the sympathetic influence on BAT. In this review we provide an update on the current knowledge of non-sympathetic hormonal and metabolic regulators that act on BAT and/or on the browning of WAT from peripheral tissues. It is worth mentioning that, despite some reports indicating differential or preferential action of regulatory factors on BAT activation relative to the promotion of WAT browning, most emerging non-adrenergic regulators appear to concurrently influence both processes and this review will report them in concert. Moreover, it will focus on agents acting at a distance rather than on autocrine factors (i.e., molecules released in situ at BAT or WAT depots that mediate local cross-talk among brown and beige/brite adipocytes and other cell types) or paracrine factors (e.g., those providing local cross-talk between immune cells and brown/beige adipocytes at adipose depots), which have been reviewed recently [17].

### **Thyroid hormones and the control of BAT activity**

Given their established thermogenic properties, thyroid hormones were possibly the first hormonal factors considered as potential non-sympathetic regulators of BAT activity [18]. In cell culture, triiodothyronine (T3) up-regulates UCP1 expression and induces thermogenic activity in brown adipocytes [19,20]. However, the main effects of T3 on BAT appear to be closely related to sympathetic activity, because the T3 in brown adipocytes is produced within these cells by the deiodination of T4 mediated by the enzyme thyroxine 5'-deiodinase, which is induced by sympathetic activity [21]. Accordingly, T3 appears to be much more of a mediator of the sympathetic control of BAT than an independent, non-sympathetic, regulator of BAT. Thyroid hormones also control BAT activity indirectly at the whole-body level by acting on the hypothalamus and, through regulation of AMP kinase, to activate the sympathetic activity [22].

### **Hepatic-derived signals that control BAT activity and WAT browning**

Among the first identified signals of hepatic origin that influence BAT activity are bile acids (BAs). In addition to their known role in the management of lipids digestion in the intestine, BAs may act as signalling molecules. BAs target cells through two known mechanisms: activation of the nuclear receptor FXR, and activation of the G protein-coupled receptor TGR5 [23]. It has been found that BAs activate TGR5 in BAT, thereby leading to cAMP-mediated intracellular induction of thermogenic processes, mainly through the induction of thyroxine 5'-deiodinase activity [24]. This is consistent with the demonstration of enhanced energy expenditure in mice, and the recent report that chenodeoxycholic acid promotes BAT activity [25]. Moreover, it has been shown that addition of cholic acid to high-fat diets suppresses diet-induced obesity in mice in a UCP1-dependent manner [26]. Although there have been several reports in humans associating circulating BAs with improved metabolic profile, consistent with a scenario of BAT activation [27,28], only recently has an effect of chenodeoxycholic acid on human BAT activity, acting via TGR5-dependent mechanisms, been directly demonstrated [29].

Fibroblast growth factor-21 (FGF21) is an endocrine member of the FGF family that is mainly released by the liver. It has powerful anti-diabetic and anti-obesity actions in rodent models [30], and there are also some indications of its healthy metabolic action in humans [31,32]. Experimental studies have demonstrated that FGF21 activates BAT and promotes the browning of WAT [33,34]. Although central effects of FGF21 through induction of sympathetic activation may mediate some of the actions of FGF21 on BAT [35,36], there is also evidence that cell-autonomous effects of FGF21 on brown adipocytes promote thermogenic activation [33]. The role of BAT activation in the systemic effects of

FGF21 was recently assessed by analysing the ability of FGF21 treatment to act on UCP1-null mice, but results were controversial [37–39]. On the other hand, considering that FGF21 is expressed in BAT and WAT, at least in rodents [40,41], the extent to which the promotion of BAT activity and WAT browning by FGF21 is mediated by systemic FGF21 delivered mainly by the liver, or on autocrine actions, is unclear. Moreover, UCP1-null mice exhibit abnormally elevated levels of FGF21 in the blood [38,42], further clouding the picture. In humans, distinct experimental and clinical studies have indicated a positive association between FGF21 levels and BAT activity [43,44].

### Intestinal signalling in the control of BAT activity

Recent research has provided evidence for the capacity of intestine-originating signals to regulate BAT activity and WAT browning. It has been found that pharmacological activation of the BA receptor FXR in the intestine strongly induced FGF15 in mice [45] in association with promotion of energy expenditure and activation of WAT browning. FGF15 (FGF19 in humans) is a hormonal factor released by the intestine which act on cells through cell surface receptors similar to those that mediate the responsiveness to FGF21 [46]. The main target of FGF15 is thought to be the liver, where FGF15 controls BA synthetic processes. However, there are indications that FGF15 can stimulate BAT and promote energy expenditure [47,48], possibly constituting an additional mechanism beyond the cell-autonomous and centrally-mediated actions of BAs in BAT noted above.

Other signalling molecules released by the intestine which influence BAT activity and/or the browning of WAT are incretins. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and other incretins are hormonal factors released by the intestine that exert anti-diabetic actions. GLP-1 analogues, such as liraglutide, are currently used for treatment of type II diabetes and obesity [49]. Experimental studies in rodent models have shown that GLP-1 and its analogue liraglutide activate BAT and are especially effective in the browning of WAT [50]. However, there is evidence that a large part of this effect is mediated indirectly via the action of GLP-1 in the hypothalamus and subsequent stimulation of sympathetic activity [50,51]. Some studies have confirmed that liraglutide increases energy expenditure in humans [51], but direct evidence of human BAT activation after treatment with GLP-1 analogues is still lacking. It is worth mentioning that BAs stimulate GLP-1 release by the intestine [52], thus providing an additional indirect mechanism for the control of BAT activity by BAs.

Despite the above mentioned findings, we are far from having a comprehensive understanding of the intestinal mechanisms that influence BAT activity, a research area that seems destined to see intense development in coming years. The current awareness of the powerful influence of intestinal microbiota variations on overall energy metabolism and obesity, both in experimental models and in humans [53], has renewed interest in understanding how changes in the gut result in systemic metabolic regulation. A recent report showing that depletion of microbiota enhances the browning of WAT [54] is expected to stimulate research to identify the molecular actors in the cross-talk between gut-associated events and the regulation of brown and/or beige adipocyte amounts and activity.

### Myokine-mediated regulation of BAT activity and WAT browning

Muscle is also a recently recognized source of signalling molecules (myokines) that target BAT and the browning of WAT. Irisin has been identified as a myokine released by skeletal muscle through the cleavage of the protein FNDC5 (fibronectin type III domain-containing 5). Experiments in rodents have indicated that irisin may be a pivotal mediator of the induction of the WAT browning that is known to occur in response to exercise [55]. The stimulatory action of irisin on the browning of white adipocytes involves the activation of p38 MAP kinase [56], a known intracellular mediator of BAT activation. Several studies have reported that irisin is expressed in human skeletal muscle [55,57], and suggested that exercise-induced irisin secretion could serve to augment brown fat thermogenesis in concert with FGF21 in humans [44]. There is some controversy surrounding the actual role of irisin in human biology [58] which warrants further research, although a recent study has confirmed the presence of irisin in human blood [59].  $\beta$ -aminoisobutyric acid (BAIBA), a small molecule released by skeletal muscle, has also been shown to possess stimulating effects on the



browning of WAT [60], and thus constitutes another potential myokine in addition to irisin that mediates signalling from muscle to adipose tissues. Notably, BAIBA appears to act through PPAR $\alpha$ , a nuclear receptor highly enriched in brown relative to white adipose cells [61]. Recently, musclin, a myokine highly homologous to natriuretic peptides, has been proposed to also act as a myokine to promote WAT browning [62].

In addition to skeletal muscle-derived myokines, the cardiac natriuretic peptides ANP and BNP, regulatory factors released by the heart (cardiomyokines) involved in the control of systemic vascular resistance, central venous pressure and natriuresis [63], have also been reported to act on BAT to promote thermogenic activation [64]. Brown adipocytes contain natriuretic peptide receptors that, when activated, induce a cGMP-mediated intracellular cascade involving the activation of p38 MAP kinase that regulates gene expression and induction of thermogenesis [64].

### Controllers of BAT activity and WAT browning of dietary origin?

There is long-standing evidence that diet may influence BAT activity and the browning of WAT. For many years, BAT activity has been suspected to contribute to so-called “diet-induced thermogenesis”, elicited according to the amount of calories consumed and gross composition of diets. On the other hand, there are also indications that bioactive molecules present in the diet (e.g. vitamins) may possess specific signalling properties that influence BAT activity and/or the browning of WAT.

There is considerable evidence from rodent studies that vitamin A derivatives, mainly retinoic acid, induce UCP1 gene expression, activating the thermogenic program in BAT and induction of the browning of WAT [65–67]. Consistent with this, there are reports that depletion of vitamin A in the diet impairs BAT activity in mice [68]. However, the physiological rationale that might explain why vitamin A induces thermogenic processes is unknown. Moreover, it is also unknown whether the amount of vitamin A in the diet is what determines this signalling pathway, considering that the generation of bioactive derivatives of vitamin A (retinoic acid, retinaldehyde) is determined by intracellular processing of vitamin A. On the other hand, it was recently proposed that human brown adipogenesis is insensitive to retinoic acid-mediated induction of UCP1, in contrast with that in rodent cells [69].

Another long-standing area of research on the potential effects of regulatory metabolites on BAT function relates to n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), reflecting the known beneficial effects of these fatty acids on adiposity and on the prevention and treatment of metabolic syndrome. Experimental studies on the supplementation of fats in the diet with n-3 PUFAs have reported variable results in terms of their capacity to induce BAT activity and/or the browning of WAT [70]. However, converging evidence from several studies indicate some effects on the browning of WAT, as highlighted by increased mitochondrial activity in WAT [71]; some studies have even reported an increase in UCP1 content [72,73]. Moreover, not all n-3 PUFAs appear to have similar effects. For example, it has been found that eicosapentaenoic acid included as a dietary supplement has a significant BAT-activating effect, whereas docosahexaenoic acid, does not [74]. Cell culture studies have confirmed the cell-autonomous effects of eicosapentaenoic acid promoting the acquisition of a beige/brite phenotype by adipogenic cells as well as differentiation and UCP1 gene expression in brown adipocytes [75,76]. It is possible that nuclear hormone receptors such as PPAR $\gamma$  or PPAR $\alpha$ , which are involved in brown/beige adipogenesis and UCP1 regulation [61,77] and are activated by fatty acid derivatives, may be involved as intracellular mediators of these effects of omega-3 PUFAs, but conclusive evidence is still lacking.

Another compound of dietary origin that influences BAT activity and WAT browning is resveratrol, a naturally occurring polyphenol present in vegetables. Resveratrol induces UCP1 expression in adipocytes in culture [78,79], and there is evidence that resveratrol activates intracellular pathways involving AMPkinase, sirtuin-1 and ultimately PGC-1 $\alpha$  [80], which are key factors in the induction of thermogenic activity in brown adipocytes. High doses of resveratrol in the diet induce BAT activity [81–83] and promote WAT browning [79]; however it is unclear whether naturally-occurring amounts of resveratrol amounts in the diet are sufficient to activate BAT.

Among the dietary bioactive compounds that have most recently received attention for their potential role in regulating BAT activity are capsaicin and its analogues. Capsaicin is the component



of hot chili peppers responsible for their pungency and is one of the most consumed spices in the world. Other non-pungent analogues of capsaicin include capsinoid compounds found in sweet red peppers. Capsaicin and capsinoids are known to increase energy expenditure and decrease body fat in both rodents and humans [84]. Relevant studies from Saito's laboratory in Japan have demonstrated that effects of capsinoid treatment are quite similar to those of cold exposure in humans. Thus, a single oral ingestion of capsinoids increased energy expenditure in humans with metabolically active BAT, but not those without it [85]. Exposure of individuals without active BAT to either cold or ingestion of capsinoids every day for 6 weeks, caused recruitment of BAT in association with increased energy expenditure and decreased body fat [86]. Capsaicin and capsinoids act through binding to the TRPV1 (the vanilloid type 1 transient receptor potential) channel in sensory neurons located in the tongue (capsaicin) and upper gastrointestinal tract (capsinoids). This selective activation of TRPV1 channels leads to activation of vagal afferent nerves that project to the ventromedial hypothalamus, which is known to control BAT-mediated thermogenesis, and promote beige adipocyte biogenesis in WAT by stimulating sympathetic efferents that innervate adipose tissues [87].

In addition to capsinoids, other food ingredients, particularly spicy ingredients found in pepper seeds (piperine) and ginger (gingerol, paradol) have been shown to activate TRPV1 and are thus capable of inducing BAT thermogenesis in a similar manner. In fact, cold exposure also activates BAT via the TRP family members TRPM8 (TRP melastin-8) and TRPA1 (TRP cation channel, subfamily A, member 1) located in sensory neurons of the body surface. Unlike TRPV1, which is a 'hot sensor', these ion channels are activated by low temperature as well as by many food ingredients including menthol, which acts as an agonist of TRPM8, and pungent isothiocyanates in wasabi and mustard, cinnamaldehyde in cinnamon and catechins in green tea, which act as agonists of TRPA1 [88].

In addition to being expressed in sensory neurons, TRP channels (e.g., TRPV1) are expressed in BAT and WAT [89], thus allowing for the possibility that part of the observed effects occurs through direct cell-autonomous action on brown (or beige/brite) adipocytes, and possibly even explaining the reported direct actions of cold on adipocytes [90]. Pharmacological activation of TRPM8 induces BAT activity in rodents in vivo [91] and also up-regulates UCP1 expression in human adipocytes in vitro [92]. In contrast, other ion channels, such as TRPV4 and the voltage-gated potassium channel Kv1.3, appear to have a repressive role in the browning of WAT [93] and the activation of existing BAT [94], respectively. In any case, regulation of these ion channels allows cell-autonomous effects on brown adipocytes, but also underlies centrally-mediated indirect effects of the sympathetic activity on BAT and WAT in vivo, and could also even be involved in direct increases in adrenergic receptor signalling in mouse inguinal WAT [95]. As a general conclusion, numerous food ingredients that act as TRP agonists are expected to activate and recruit BAT, and so could safely be used to prevent obesity in daily life.

Finally, inorganic nitrate, once considered a non-bioactive end product of nitric oxide (NO) metabolism and even a potentially toxic food component, has recently been shown to induce thermogenic gene expression in BAT and also browning of WAT in mice [96]. The dietary effects of nitrate occur through a nitrate-nitrite-NO reduction process distinct from the physiological NO synthase-dependent pathway that ultimately signals through the cGMP cascade [96], as previously described for natriuretic peptide-induced effects on BAT and browning activation [64]. Hence, because dietary ingestion of inorganic nitrate is mainly achieved through consumption of green leafy vegetables, the reported nitrate-induced effects could contribute to the metabolic benefits of vegetable-rich diets [97].

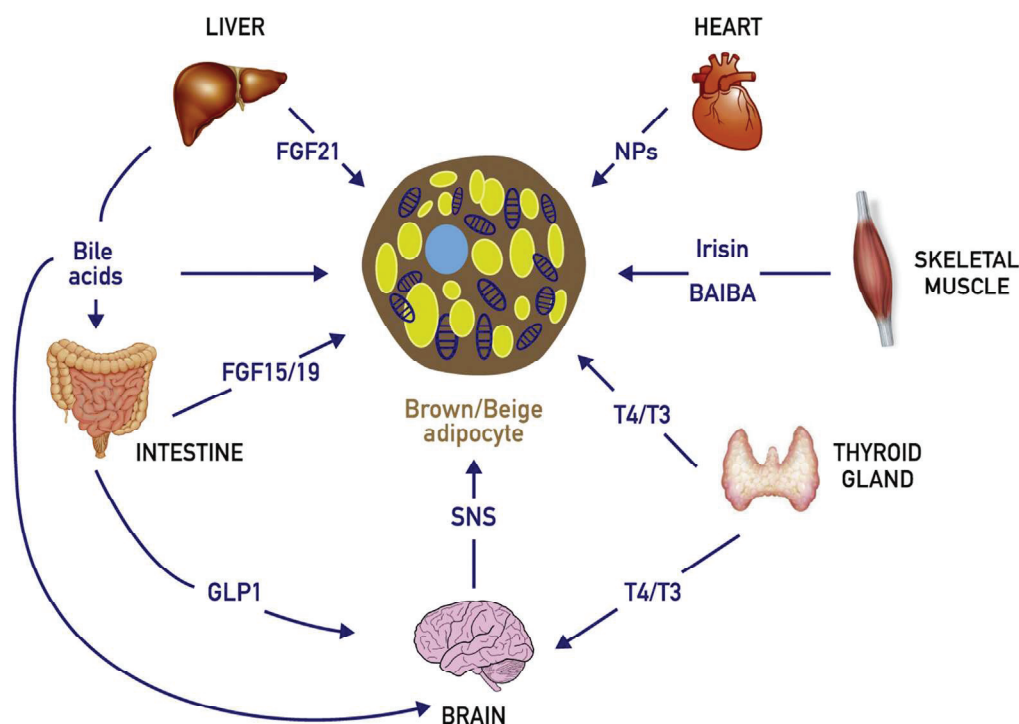
### **The emerging metabolite-mediated regulation of BAT activity**

In addition to the multiple hormones and vitamins mentioned above, there is a growing recognition of metabolites as signalling molecules capable of influencing BAT activity. Lactate and  $\beta$ -OH butyrate have been found to induce the browning of murine white adipose cells, with functional up-regulation of UCP1 expression [98]. However, the effects of lactate are not entirely direct, because both in vivo and in vitro, they appear to involve the induction of FGF21 in brown adipocytes, which may act in an autocrine manner [99]. The promotion of BAT activity and the browning

by these metabolites has been proposed as an adaptive mechanism that serves to alleviate redox pressure rather than as thermogenic process per se [98]. Other metabolites recently found to activate BAT include short-chain fatty acids. Acetate has recently been reported to induce morphological and molecular changes in brown adipocytes during adipogenesis, including up-regulation of UCP1 gene expression, through mechanisms involving the activation of G protein-coupled receptor-43 [100].

## Summary

BAT is a major site of energy expenditure and metabolite oxidation. Accordingly, BAT activity is considered protective against obesity, hyperglycaemia and hyperlipidaemia. The activity of BAT (as well as the so-called “browning” process, responsible for the appearance of brown adipocyte-like cells in white fat) are traditionally considered to be driven by the sympathetic nervous system acting upon the tissue via noradrenaline release at nerve endings. However, recent research has led to the recognition of multiple other signalling mechanisms originating in distinct tissues and organs, by which brown fat activity is modulated. Hormonal factors arising from these different tissues, including FGF21 and BAs from liver, irisin from muscle, natriuretic peptides from heart, and GLP-1 from intestine, among others, activate brown fat activity (Fig. 1). Several dietary bioactive molecules, such as capsaicins and omega-3 PUFAs, also appear to promote brown fat activity and/or the browning of WAT. The action of these endogenous and dietary molecules on BAT occurs directly or indirectly through specific modulation of the sympathetic influence on brown fat. The growing awareness of meaningful amounts of active BAT in adult humans and impaired brown fat activity in obese patients has renewed research interest in this



**Fig. 1.** Representation of the main endocrine factors that activate brown and/or beige adipocyte thermogenic activity and recruitment. BAIBA, β-aminoisobutyric acid; FGF21, fibroblast growth factor; GLP-1, glucagon-like peptide-1; NPs, natriuretic peptides; SNS, sympathetic nervous system; T4/T3, thyroxine/triiodothyronine.

field, especially considering the need to understand specific physiological mechanisms of BAT regulation with potential for use as pharmacological and/or nutritional strategies to increase energy expenditure in the fight against obesity and associated metabolic disorders.

#### Research agenda

- Suitable cell culture models representative of human brown and beige/brite cells are needed to develop high-throughput screening of molecules with the potential to activate BAT.
- There is a need to improve our understanding of the actions on human BAT of non-sympathetic regulators of brown fat identified in experimental models.
- Research that seeks to identify molecules that activate BAT by exploring intestine-mediated signalling should be stressed so as to exploit the ease with which dietary-mediated interventions can influence metabolism.
- Assessment of the actual amounts and bioavailability of bioactive compounds in food with existing experimental evidence of BAT-activating properties should be performed to guide further clinical assays and/or intervention studies in obese patients.

#### Acknowledgements

Supported by grants SAF2014-55725 (Ministerio de Ciencia e Innovación) and PI14/00063 (Instituto de Salud Carlos III, Spain), co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF). Funding agencies had no role on collection, analysis and interpretation of data.

#### References

- [1] Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004;84:277–359.
- [2] Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 1993;366:740–2.
- [3] Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, et al. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 2009;9:203–12.
- [4] Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 2011;17:200–5.
- [5] Giralt M, Villarroya F. Mitochondrial uncoupling and the regulation of glucose homeostasis. *Curr Diabetes Rev* 2016. In press.
- [6] Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Guertin DA. Emerging complexities in adipocyte origins and identity. *Trends Cell Biol* 2016;26:313–39.
- [7] Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, et al. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep* 2013;5:1196–399.
- [8] Nedergaard J, Cannon B. The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab* 2014;20:396–407.
- [9] Labbé SM, Caron A, Chechi K, et al. Metabolic activity of brown, “beige” and white adipose tissues in response to chronic adrenergic stimulation in male mice. *Am J Physiology-Endocrinology Metabolism* 2016;311:E260–8.
- [10] Guerra C, Koza RA, Yamashita H, et al. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Investigation* 1998;102:412–32.
- [11] Kazak L, Chouchani ET, Jedrychowski MP, et al. A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell* 2015;163:643–98.
- [12] Betz MJ, Enerbäck S. Human brown adipose tissue: what we have learned so far. *Diabetes* 2015;64:2352–412.
- [13] Yen M, Ewald MB. Toxicity of weight loss agents. *J Med Toxicol* 2012;8:145–52.
- [14] Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C, et al. Activation of human brown adipose tissue by a  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab* 2015;21:33–41.
- [15] Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, et al. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab* 2012;15:480–91.
- [16] Villarroya F, Vidal-Puig A. Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab* 2013;17:638–81.
- [17] Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, et al. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 2016. In press.
- [18] Bianco AC, McAninch EA. The role of thyroid hormone and brown adipose tissue in energy homeostasis. *Lancet Diabetes & Endocrinol* 2013;1:250–8.
- [19] Guerra C, Porras A, Roncero C, et al. Triiodothyronine induces the expression of the uncoupling protein in long term fetal rat brown adipocyte primary cultures: role of nuclear thyroid hormone receptor expression. *Endocrinology* 1994;134:1067–141.

- [20] Rabelo R, Reyes C, Schiffman A, et al. Interactions among receptors, thyroid hormone response elements, and ligands in the regulation of the rat uncoupling protein gene expression by thyroid hormone. *Endocrinology* 1996; 137:3478–86.
- [21] Silva JE, Larsen PR. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* 1983;305: 712–5.
- \*[22] López M, Varela L, Vázquez MJ, et al. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med* 2010;16:1001–9.
- [23] Ma H, Patti ME. Bile acids, obesity, and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterology* 2014;28: 573–656.
- \*[24] Watanabe M, Houten SM, Matakai C, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 2006;439:484–93.
- [25] Teodoro JS, Zouhar P, Flachs P, et al. Enhancement of brown fat thermogenesis using chenodeoxycholic acid in mice. *Int J Obes* 2014;38:1027–61.
- [26] Zietak M, Kozak LP. Bile acids induce uncoupling protein 1-dependent thermogenesis and stimulate energy expenditure at thermoneutrality in mice. *Am J Physiology-Endocrinology Metabolism* 2016;310:E346–400.
- [27] Patti ME, Houten SM, Bianco AC, et al. Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obes (Silver Spring)* 2009;17:1671–8.
- [28] Ockenga J, Valentini L, Schuetz T, et al. Plasma bile acids are associated with energy expenditure and thyroid function in humans. *J Clin Endocrinol Metabolism* 2012;97:535–77.
- [29] Broeders EP, Nascimento EB, Havekes B, et al. The bile acid chenodeoxycholic acid increases human brown adipose tissue activity. *Cell Metab* 2015;22:418–44.
- [30] Giral M, Gavalda-Navarro A, Villarroya F. Fibroblast growth factor-21, energy balance and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2015;418:66–73.
- [31] Gaich G, Chien JY, Fu H, et al. The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab* 2013;18:333–73.
- [32] Talukdar S, Zhou Y, Li D, et al. A long-acting FGF21 molecule, PF-05231023, decreases body weight and improves lipid profile in non-human primates and type 2 diabetic subjects. *Cell Metab* 2016;23:427–67.
- \*[33] Hondares E, Rosell M, Gonzalez FJ, et al. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* 2010;11:206–18.
- [34] Fisher FM, Kleiner S, Douris N, et al. FGF21 regulates PGC-1 $\alpha$  and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes & Dev* 2012;26:271–352.
- [35] Owen BM, Ding X, Morgan DA, et al. FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. *Cell Metab* 2014;20:670–7.
- [36] Douris N, Stevanovic DM, Fisher FM, et al. Central fibroblast growth factor 21 browns white fat via sympathetic action in male mice. *Endocrinology* 2015;156:2470–551.
- [37] Véniant MM, Sivits G, Helmering J, et al. Pharmacological effects of FGF21 are independent of the “browning” of white adipose tissue. *Cell Metab* 2015;21:731–9.
- [38] Samms RJ, Smith DP, Cheng CC, et al. Discrete aspects of FGF21 in vivo pharmacology do not require UCP1. *Cell Rep* 2015;11:991–1000.
- [39] Kwon MM, O'Dwyer SM, Baker RK, et al. FGF21-Mediated improvements in glucose clearance require uncoupling protein 1. *Cell Rep* 2015;13:1521–8.
- [40] Hondares E, Iglesias R, Giral A, et al. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 2011;286:12983–3073.
- [41] Dutchak PA, Katafuchi T, Bookout AL, et al. Fibroblast growth factor-21 regulates PPAR $\gamma$  activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell* 2012;148:556–623.
- [42] Keipert S, Kutsechke M, Lamp D, et al. Genetic disruption of uncoupling protein 1 in mice renders brown adipose tissue a significant source of FGF21 secretion. *Mol Metab* 2015;4:537–79.
- [43] Hanssen MJ, Broeders E, Samms RJ, et al. Serum FGF21 levels are associated with brown adipose tissue activity in humans. *Sci Rep* 2015;5:10275. <http://dx.doi.org/10.1038/srep10275>.
- [44] Lee P, Linderman JD, Smith S, et al. Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metab* 2014;19:302–11.
- \*[45] Fang S, Suh JM, Reilly SM, et al. Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nat Med* 2015;21:159–224.
- [46] Owen BM, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Tissue-specific actions of the metabolic hormones FGF15/19 and FGF21. *Trends Endocrinol Metabolism* 2015;26:22–31.
- [47] Fu L, John LM, Adams SH, et al. Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology* 2004;145:2594–3197.
- [48] Tomlinson E, Fu L, John L, et al. Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology* 2002;143:1741–8.
- [49] Ryan D, Acosta A. GLP-1 receptor agonists: nonglycemic clinical effects in weight loss and beyond. *Obes (Silver Spring)* 2015;23:1119–48.
- [50] Lockie SH, Heppner KM, Chaudhary N, et al. Direct control of brown adipose tissue thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Diabetes* 2012;61:2753–815.
- \*[51] Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, et al. GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes* 2014;63:3346–404.
- [52] Thomas C, Gioiello A, Noriega L, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 2009; 10:167–77.
- [53] Cox LM, Blaser MJ. Pathways in microbe-induced obesity. *Cell Metab* 2013;17:883–977.
- [54] Suárez-Zamorano N, Fabbiano S, Chevalier C, et al. Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nat Med* 2015;21:1497–998.



- [55] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012;481:463–73.
- [56] Zhang Y, Li R, Meng Y, et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. *Diabetes* 2014;63:514–39.
- [57] Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serrano M, et al. Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metabolism* 2013;98:E769–847.
- [58] Elsen M, Raschke S, Eckel J. Browning of white fat: does irisin play a role in humans? *J Endocrinol* 2014;222: R25–63.
- [59] Jedrychowski MP, Wrann CD, Paulo JA, et al. Detection and quantitation of circulating human irisin by tandem mass spectrometry. *Cell Metab* 2015;22:734–74.
- [60] Roberts LD, Boström P, O'Sullivan JF, et al.  $\beta$ -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic  $\beta$ -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell Metab* 2014;19:96–204.
- [61] Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* 2001;276:1486–579.
- [62] Jeremic N, Chatuverdi P, Tyagi SC. Browning of white fat: novel insight into factors, mechanisms and therapeutics. *J Cell Physiology* 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.25450>. In press.
- [63] Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 2006;27:47–119.
- \*[64] Bordinchia M, Liu D, Amri EZ, et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Investigation* 2012;122:1022–58.
- [65] Alvarez R, de Andrés J, Yubero P, et al. A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J Biol Chem* 1995;270:5666–56739.
- \*[66] Villarroya F, Giral M & Iglesias R. Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int J Obes Relat Metabolic Disord* 1999;23:1–7.
- [67] Mercader J, Ribot J, Murano I, et al. Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology* 2006;147:5325–57.
- [68] Bonet ML, Oliver J, Picó C, et al. Opposite effects of feeding a vitamin A-deficient diet and retinoic acid treatment on brown adipose tissue uncoupling protein 1 (UCP1), UCP2 and leptin expression. *J Endocrinol* 2000;166:511–8.
- [69] Murholm M, Isidor MS, Basse AL, et al. Retinoic acid has different effects on UCP1 expression in mouse and human adipocytes. *BMC Cell Biol* 2013;14:41. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2121-14-41>.
- [70] Flachs P, Rossmel M, Kopecky J. The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiological Res* 2014;63:S93–118.
- [71] Flachs P, Rühl R, Hensler M, et al. Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white at dietary obese mice in response to calorie restriction and omega fatty acids. *Diabetologia* 2011;54:2626–64.
- [72] Sadurskis A, Dicker A, Cannon B, et al. Polyunsaturated fatty acids recruit brown adipose tissue: increased UCP content and NST capacity. *Am J Physiology* 1995;269:E351–411.
- [73] Takahashi Y, Ide T. Dietary omega fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. *Br J Nutr* 2000;84:175–259.
- [74] Oudart H, Groscolas R, Calgari C, et al. Brown fat thermogenesis in rats fed high-fat diets enriched with omega polyunsaturated fatty acids. *Int J Obes Relat Metabolic Disord* 1997;21:955–1017.
- [75] Zhao M, Chen X. Eicosapentaenoic acid promotes thermogenic and fatty acid storage capacity in mouse subcutaneous adipocytes. *Biochem Biophysical Res Commun* 2014;450:1446–97.
- [76] Fleckenstein-Elsen M, Dinnies D, Jelenik T, et al. Eicosapentaenoic acid and arachidonic acid differentially regulate adipogenesis, acquisition of a brite phenotype and mitochondrial function in primary human adipocytes. *Mol Nutr Food Res* 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201500892>. In press.
- [77] Sears IB, MacGinnitie MA, Kovacs LG, et al. Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 1996;16: 3410–9.
- [78] Mercader J, Palou A, Bonet ML. Resveratrol enhances fatty acid oxidation capacity and reduces resistin and Retinol-Binding Protein 4 expression in white adipocytes. *J Nutr Biochem* 2011;22:828–34.
- [79] Wang S, Liang X, Yang Q, et al. Resveratrol induces brown-like adipocyte formation in white fat through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK)  $\alpha$ 1. *Int J Obes* 2015;39:967–76.
- [80] de Ligt M, Timmers S, Schrauwen P. Resveratrol and obesity: can resveratrol relieve metabolic disturbances? *Biochimica Biophysica Acta* 2015;1852:1137–44.
- [81] Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* 2006;127:1109–22.
- [82] Alberdi G, Rodriguez VM, Miranda J, et al. Thermogenesis is involved in the body-fat lowering effects of resveratrol in rats. *Food Chem* 2013;141:1530–5.
- [83] Andrade AC, Frade AC, Guimaraes JB, et al. Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *Eur J Nutr* 2014;53:1503–10.
- [84] Yoneshiro T, Saito M. Transient receptor potential activated brown fat thermogenesis as a target of food ingredients for obesity management. *Curr Opin Clin Nutr Metabolic Care* 2013;16:625–31.
- [85] Yoneshiro T, Aita S, Kawai Y, et al. Nonpungent capsaicin analogs (capsinoids) increase energy expenditure through the activation of brown adipose tissue in humans. *Am J Clin Nutr* 2012;95:845–50.
- \*[86] Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, et al. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Investigation* 2013;123:3404–8.
- [87] Seoane-Collazo P, Fernø J, Gonzalez F, et al. Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine* 2015; 50:276–91.

- [88] Saito M, Yoneshiro T, Matsushita M. Food ingredients as anti-obesity agents. *Trends Endocrinol Metabolism* 2015;26:585–7.
- [89] Bishnoi M, Kondepudi KK, Gupta A, et al. Expression of multiple Transient Receptor Potential channel genes in murine 3T3-L1 cell lines and adipose tissue. *Pharmacol Rep* 2013;65:751–5.
- [90] Ye L, Wu J, Cohen P, et al. Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:12480–5.
- [91] Ma S, Yu H, Zhao Z, et al. Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity. *J Mol Cell Biol* 2012;4:88–96.
- [92] Rossato M, Granzotto M, Macchi V, et al. Human white adipocytes express the cold receptor TRPM8 which activation induces UCP1 expression, mitochondrial activation and heat production. *Mol Cell Endocrinol* 2013;383:137–46.
- [93] Ye L, Kleiner S, Wu J, et al. TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. *Cell* 2012;151:96–110.
- [94] Upadhyay SK, Eckel-Mahan KL, Mirbolooki MR, et al. Selective Kv1.3 channel blocker as therapeutic for obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:E2239–48.
- [95] Ohyama K, Nogusa Y, Shinoda K, et al. A synergistic antiobesity effect by a combination of capsinoids and cold temperature through promoting beige adipocyte biogenesis. *Diabetes* 2016;65:1410–23.
- [96] Roberts LD, Ashmore T, Kotwica AO, et al. Inorganic nitrate promotes the browning of white adipose tissue through the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *Diabetes* 2015;64:471–84.
- [97] Carter P, Gray LJ, Troughton J, et al. Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: systematic review and metaanalysis. *BMJ* 2010;341:c4229.
- [98] Carrière A, Jeanson Y, Berger-Müller S, et al. Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. *Diabetes* 2014;63:3253–318.
- [99] Jeanson Y, Ribas F, Galinier A, et al. Lactate induces FGF21 expression in adipocytes through a p38-MAPK pathway. *Biochem J* 2016;473:685–777.
- [100] Hu J, Kyrou I, Tan BK, et al. Short-chain fatty acid acetate stimulates adipogenesis and mitochondrial biogenesis via GPR43 in brown adipocytes. *Endocrinology* 2016;157:1881–975.



## **Lipopolysaccharide-binding protein is a negative regulator of adipose tissue browning in mice and humans**

**Revista:** Diabetologia

**PMID:** 27344313

**Títol:** La proteïna d'unió a lipopolisacàrid és un regulador negatiu del browning del teixit adipós en ratolins i en humans

**Resum:**

**OBJECTIUS/HIPÒTESI:** La biosíntesi de la proteïna d'unió a lipopolisacàrid (LBP) en els adipòcits es troba associada amb la disfunció del teixit adipós induïda per l'obesitat. El nostre objectiu va ser estudiar el paper de la LBP en la regulació del browning del teixit adipós.

**METODOLOGIA:** Per tal d'induir el browning del teixit adipós blanc, es van mantenir ratolins a 4°C durant 3 setmanes, o bé es van tractar ratolins amb l'agonista  $\beta$ 3-adrenèrgic CL316,243 durant 1 setmana. Es van cultivar cèl·lules precursors provinents de teixit adipós marró o blanc en condicions propícies per a la diferenciació en adipòcits marrons o beix respectivament. In vitro, es va silenciar (knock down) l'expressió de Lbp en adipòcits 3T3-L1, i es va tractar les cèl·lules amb LBP recombinant o es van dur a terme un co-cultiu en transwells amb adipòcits 3T3-L1 controls. Es van usar ratolins deficients en Lpb o de soca salvatge alimentats amb dieta estàndard o rica en greixos (HFD) durant 12 setmanes. En humans, es van obtenir mostres de teixit adipós subcutani i visceral d'una cohort amb participants amb obesitat mòrbida.

**RESULTATS:** La inducció del browning del teixit adipós blanc en ratolins a través de l'exposició al fred, o a través del tractament amb CL316,243, va trobar-se fortament associada amb una reducció de l'expressió de l'mRNA de Lbp en el teixit adipós blanc. L'adquisició del fenotip beix en cèl·lules en cultiu va trobar-se associat amb una regulació negativa de Lbp. A més a més, el silenciament de Lbp va induir l'expressió de gens relacionats amb el greix marró, mentre que el tractament amb LBP va revertir aquest efecte. Els ratolins deficients en Lpb presentaven browning del teixit adipós subcutani de manera espontània, fet evidenciat per un increment remarcable en l'expressió gènica de Ucp1 i Dio2 i per l'aparició de zones amb agrupacions d'adipòcits multivacuolars. La quantitat i activitat del teixit adipós marró també es van trobar incrementades en els ratolins deficients en Lbp. Aquests canvis en els ratolins deficients en Lbp es van trobar associats amb una reducció en el guany de pes corporal i amb una protecció envers la resposta inflamatòria induïda per la HFD, com mostra la reducció dels nivells de IL-6. Malgrat això, en comptes de millorar la homeòstasi de la glucosa, aquests efectes desencadenen intolerància a la glucosa i resistència a la insulina.

**CONCLUSIONS/INTERPRETACIÓ:** S'ha identificat la LBP com un regulador negatiu del procés de browning, essent aquest un dels factors que probablement contribueixi a les accions promotores de l'obesitat de la LBP. Els efectes perjudicials en el metabolisme de la falta de LBP són compatibles amb el concepte que és necessària una regulació apropiada de les vies inflamatòries per a un perfil metabòlic sistèmic sa, independentment de la regulació del pes corporal.





ARTICLE

# Lipopolysaccharide-binding protein is a negative regulator of adipose tissue browning in mice and humans

Aleix Gavalda-Navarro<sup>1,2,3,4</sup> · José M. Moreno-Navarrete<sup>4,5</sup> ·  
Tania Quesada-López<sup>1,2,3,4</sup> · Montserrat Cairó<sup>1,2,3,4</sup> · Marta Giralt<sup>1,2,3,4</sup> ·  
José M. Fernández-Real<sup>4,5</sup> · Francesc Villarroya<sup>1,2,3,4</sup>

Received: 5 January 2016 / Accepted: 25 May 2016 / Published online: 25 June 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

## Abstract

**Aims/hypothesis** Adipocyte lipopolysaccharide-binding protein (LBP) biosynthesis is associated with obesity-induced adipose tissue dysfunction. Our purpose was to study the role of LBP in regulating the browning of adipose tissue.

**Methods** Adult mice were maintained at 4°C for 3 weeks or treated with the  $\beta_3$ -adrenergic agonist, CL316,243, for 1 week to induce the browning of white fat. Precursor cells from brown and white adipose tissues were cultured under differentiation-inducing conditions to yield brown and beige/brite adipocytes, respectively. In vitro, *Lbp* was knocked down in 3T3-L1 adipocytes, and cells were treated with recombinant LBP or co-cultured in transwells with control 3T3-L1 adipocytes. Wild-type and *Lbp*-null mice, fed a standard or high fat diet (HFD) for 15 weeks, were also used in investigations. In humans, subcutaneous and visceral adipose

tissue samples were obtained from a cohort of morbidly obese participants.

**Results** The induction of white fat browning by exposure of mice to cold or CL316,243 treatment was strongly associated with decreased *Lbp* mRNA expression in white adipose tissue. The acquisition of the beige/brite phenotype in cultured cells was associated with downregulation of *Lbp*. Moreover, silencing of *Lbp* induced the expression of brown fat-related genes in adipocytes, whereas LBP treatment reversed this effect. *Lbp*-null mice exhibited the spontaneous induction of subcutaneous adipose tissue browning, as evidenced by a remarkable increase in *Ucp1* and *Dio2* gene expression and the appearance of multivacuolar adipocyte clusters. The amount of brown adipose tissue, and brown adipose tissue activity were also increased in *Lbp*-null mice. These changes were associated with decreased weight gain in *Lbp*-null mice and protection against HFD-induced inflammatory responses, as shown by reduced IL-6 levels. However, rather than improving glucose homeostasis, these effects led to glucose intolerance and insulin resistance.

**Conclusions/interpretation** LBP is identified as a negative regulator of the browning process, which is likely to contribute to the obesity-promoting action of LBP. The deleterious metabolic effects of LBP deletion are compatible with the concept that the appropriate regulation of inflammatory pathways is necessary for a healthy systemic metabolic profile, regardless of body weight regulation.

**Keywords** Brown adipose tissue · Browning · High-fat diet · Lipopolysaccharide-binding protein · Obesity

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00125-016-4028-y) contains peer-reviewed but unedited supplementary material, which is available to authorised users.

✉ Francesc Villarroya  
fvillarroya@ub.edu

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>2</sup> The Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Spain  
<http://www.ciberobn.es/en>

<sup>5</sup> Section of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi), Hospital of Girona “Dr Josep Trueta”, Girona, Spain

## Abbreviations

BAT	Brown adipose tissue
eWAT	Epididymal white adipose tissue
HFD	High fat diet

iBAT	Interscapular brown adipose tissue
ITT	Insulin tolerance test
iWAT	Inguinal white adipose tissue
LBP	Lipopolysaccharide-binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
SAT	Subcutaneous adipose tissue
shControl	Control small hairpin RNA
shLBP	Small hairpin RNA-mediated LBP knockdown
shRNA	Small hairpin RNA
UCP1	Uncoupling protein 1
VAT	Visceral adipose tissue
WAT	White adipose tissue
WT	Wild-type

## Introduction

Obesity is characterised by lipid accumulation in white adipose tissue (WAT) as a consequence of a disturbed energy balance due to increased food energy intake and/or lowered energy expenditure. Importantly, it is associated with an increased incidence of metabolic disorders, especially type 2 diabetes mellitus [1].

Brown adipose tissue (BAT) is characterised by the presence of multivacuolar adipocytes with a thermogenic capacity that reflects the natural uncoupling of their mitochondria, as mediated by uncoupling protein 1 (UCP1). BAT is the main site of adaptive energy expenditure in response to cold and possibly to diet [2]. In experimental models, enhanced BAT activity is associated with protection against obesity, whereas impaired BAT activity favours an obese phenotype. Moreover, BAT is a major site of lipid breakdown and glucose uptake; therefore, BAT activation is associated with improvements in hyperlipidaemia and hyperglycaemia [3, 4]. In humans, it was previously thought that BAT is only present in neonates. However, more recent research has established that adult humans retain substantial BAT activity [5, 6]. In addition to the presence of BAT at defined anatomical locations, recent studies have attached special relevance to the WAT browning process [7]. This phenomenon consists of the appearance of functionally thermogenic brown adipocyte-like cells (so-called beige or brite adipocytes) in WAT depots. Several studies in mice have indicated that the capacity to activate this process may protect against diet-induced obesity and systemic metabolic disturbances [8, 9], although the actual relevance of adipose tissue browning to metabolism is still a matter of debate [10, 11].

Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) is a type I acute-phase reactant protein, thought to be mainly produced by the liver [12]. LBP facilitates the binding of the lipid A component of LPS to CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) [13], thus modulating the immunostimulatory capacity of LPS

in bacterial infections [14]. LBP is also present in adipose tissues and high levels of LBP synthesis in white adipocytes are associated with WAT dysfunction in obesity [15]. LBP expression is associated with inflammatory markers and is increased with metabolic deterioration and insulin resistance in obese patients [16]. Here, we sought to establish the role of LBP in the browning of WAT. We investigated the association of *Lbp* expression with browning and studied alterations in browning and metabolism in *Lbp*-null mice.

## Methods

**Exposure of mice to chronic cold and treatment with CL316,243** The care and use of mice was carried out in accordance with the European Community Council Directive 86/609/EEC and approved by the Institutional Animal Care Committee of the University of Barcelona. C57BL/6 mice (Harlan Laboratories; Indianapolis, IN, USA) were maintained under standard conditions (12 h light/12 h dark cycle,  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Where indicated, 3-month-old mice were exposed to  $4^\circ\text{C}$  for 3 weeks, or 2-month-old mice received daily i.p. injections with 1 mg/kg CL316,243 for 8 days (see electronic supplementary material [ESM] [Methods](#); exposure of mice to chronic cold, and treatment of mice with CL316,243, for further details).

**Adipocyte culture** For primary adipocyte cultures, the stromal-vascular fraction was isolated from the inguinal WAT (iWAT) and interscapular BAT (iBAT) depots of 1-month-old mice. Pre-adipocytes were induced to differentiate into beige/brite and brown adipocytes, respectively, as previously reported [17, 18]. Differentiated beige/brite and brown adipocytes were treated with  $0.5 \mu\text{mol/l}$  noradrenaline (norepinephrine) for 6 h. Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts (ATCC; LGC Standards, Barcelona, Spain) was induced by treatment with  $0.86 \mu\text{mol/l}$  insulin,  $0.5 \mu\text{mol/l}$  dexamethasone and  $0.5 \text{ mmol/l}$  3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) for 2 days, followed by  $0.86 \mu\text{mol/l}$  insulin alone for 5 days. See ESM [Methods](#) for further details.

**LBP knockdown and co-culture experiments** Stable silencing of *Lbp* was achieved by transfecting 3T3-L1 fibroblasts with small hairpin (interfering) RNA (shRNA) targeting mouse *Lbp* (shLBP) or control shRNA (shControl) (Sigma Mission shRNA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) as previously reported [16], generating transfected cells described in this paper as shRNA-mediated LBP knockdown (shLBP) or control (shControl) cells, respectively. Where indicated, shLBP adipocytes were incubated with  $10 \text{ ng/ml}$  LBP (R&D Systems; Minneapolis, MN, USA) during differentiation. Differentiated shLBP or shControl 3T3-L1 adipocytes were placed on one side of a Transwell plate (VWR-

International Eurolab, Barcelona, Spain) and co-cultured with shLBP adipocytes on the other side. See ESM [Methods](#) for further details.

**Lbp-null mouse studies** *Lbp*-knockout mice (C.129P2-Lbptm1Jack/J, Balb strain background; obtained from The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were maintained at  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Five-week-old male *Lbp*-null and wild-type (WT) littermate mice were fed standard chow (CTRL) or a high fat diet (HFD) for 15 weeks. For GTTs, 2.5 g glucose/kg was administered i.p. to mice starved for 6 h. For insulin tolerance tests (ITTs), 0.75 IU/kg insulin (Actrapid; Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) was administered i.p. Plasma glucose (Accutrend; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), plasma insulin (BioVendor, Brno, Czech Republic), adiponectin (Life Technologies, Foster City, CA, USA), leptin, resistin and IL-6 (Millipore; Billerica, MA, USA), NEFA and 3-hydroxybutyrate (Wako Chemicals; Neuss, Germany), and triacylglycerols (Sigma-Aldrich) were assessed. Samples of iBAT or iWAT (25–50 mg) were incubated with 55.5 kBq/ml [ $^{14}\text{C}$ ]D-glucose (Hartmann Analytic, Braunschweig, Germany) for 3 h. Disintegrations per minute (DPM) from  $^{14}\text{CO}_2$  retained in a  $\text{CO}_2$  trap and [ $^{14}\text{C}$ ]tissue lipid extracts [19] were measured (Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA). See ESM [Methods](#) for further details.

**Human study** Paired subcutaneous and visceral adipose tissue (VAT) samples ( $n=38$ ) from a cohort of morbidly obese ( $\text{BMI} > 35 \text{ kg/m}^2$ ) participants were studied. These participants were recruited, gave written informed consent, and were validated and approved by the ethical committee at the Hospital of Girona ‘Dr Josep Trueta’. Samples were obtained from subcutaneous adipose tissue (SAT) and VAT depots during elective surgical procedures. See ESM [Methods](#) for further details.

**RNA isolation, cDNA synthesis and real-time PCR** Total RNA was isolated (Macherey-Nagel, Düren, Germany) from BAT, iWAT, eWAT and liver samples from mice, and SAT and VAT samples from humans and retrotranscribed using TaqMan Reverse Transcription Reagents (Life Technologies). For the quantitative analysis of mRNA, TaqMan quantitative real-time PCR was performed on a 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies) using the specific primer pair/probe sets, as described in ESM Table 1. See ESM [Methods](#) for further details.

**Western blot assays** Western blot analysis was performed on BAT and iWAT samples following standard procedures, using primary anti-UCP1 (1:1000; Abcam, Cambridge, UK) and anti- $\beta$ -actin (1:5000; Sigma-Aldrich) antibodies. Both antibodies were diluted in  $1 \times$  PBS containing 0.1%

Tween-20, as per manufacturer’s instructions. See ESM [Methods](#) for further details.

**Statistical methods** Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, USA). The statistical significance of differences was assessed using unpaired Student’s *t* tests, one-way ANOVA with Tukey’s multiple comparison test, or two-way ANOVA with Bonferroni post-testing, as appropriate.

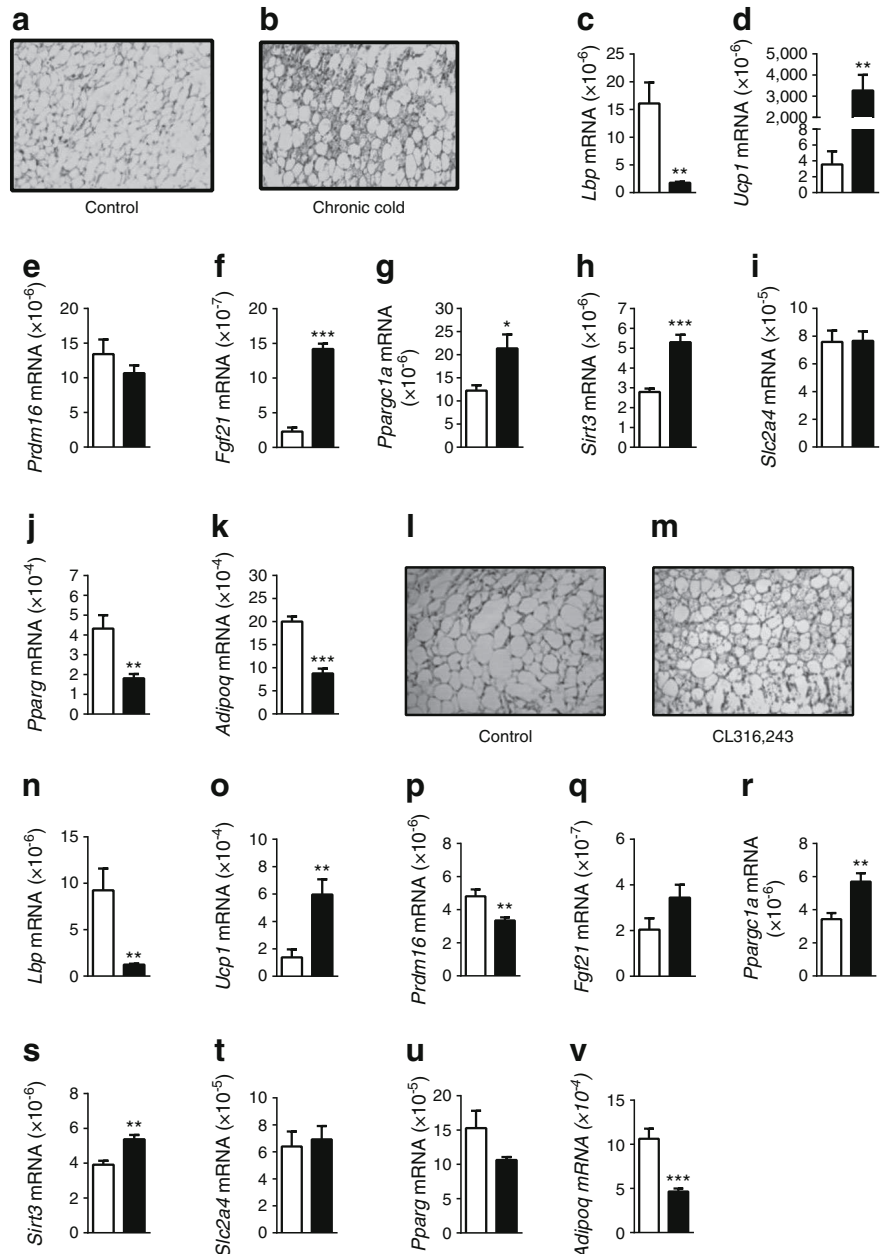
## Results

**Induction of browning in subcutaneous WAT is associated with reduced *Lbp* expression** We subjected mice to long-term cold exposure ( $4^\circ\text{C}$  for 3 weeks) and then examined *Lbp* gene expression in adipose tissue depots. As expected, cold exposure increased expression of the thermogenesis-related genes *Ucp1*, *Sirt3*, *Fgf21* and *Ppargc1a* in subcutaneous WAT (i.e. iWAT; Fig. 1d–h); it also induced the browning process, indicated by the appearance of large amounts of multilocular adipocytes (Fig. 1a,b). These changes were associated with a marked reduction in *Lbp* expression (Fig. 1c). *Lbp* expression in visceral WAT (i.e. epididymal WAT [eWAT]), a WAT site less prone to browning, was also decreased in mice exposed to chronic cold, albeit to lesser extent (ESM Fig. 1a). In contrast, chronic cold exposure did not modify *Lbp* expression in iBAT (ESM Fig. 1h), even though we observed significant induction of thermogenesis-related genes in this tissue (ESM Fig. 1i–n).

Chronic treatment of mice with the  $\beta_3$ -adrenergic agonist CL316,243 (a model of induction of browning in iWAT and eWAT [20]), triggered the appearance of multilocular adipocytes (Fig. 1l, m), induced thermogenesis-related gene expression (Fig. 1o–v) and strongly repressed *Lbp* gene expression (Fig. 1n) in iWAT and eWAT (ESM Fig. 2a–i). Although iBAT also showed signs of activation following CL316,243 treatment (e.g. the induction of *Dio2* and *Bmp8b*), *Lbp* expression was not significantly altered in this tissue (ESM Fig. 2l–r). Overall, our results suggest that the downregulation of LBP is more strongly associated with WAT browning than with the induction of thermogenesis in iBAT.

***Lbp* expression is involved in the repression of browning in adipocytes** In order to determine whether the inverse relationship between *Lbp* expression and browning is a cell-autonomous phenomenon, we used rosiglitazone-induced browning (i.e. acquisition of the beige/brite phenotype) in precursor cells obtained from iWAT [17, 21]. Incubation of iWAT precursor cells with rosiglitazone during differentiation induced the expression of several marker genes for browning (Fig. 2b–f), and repressed *Lbp* expression (Fig. 2a), without

**Fig. 1** Cold and  $\beta_3$ -adrenergic induction of iWAT browning is associated with reduced *Lbp* expression. **(a, b)** Micrographs (magnification  $\times 20$ ) of iWAT from **(a)** control mice or **(b)** mice maintained at  $4^\circ\text{C}$  for 3 weeks (chronic cold). **(c–k)** Transcript levels of **(c)** *Lbp*, **(d)** *Ucp1*, **(e)** *Prdm16*, **(f)** *Fgf21*, **(g)** *Ppargc1a*, **(h)** *Sirt3*, **(i)** *Slc2a4*, **(j)** *Pparg* and **(k)** *Adipoq* from control mice (white bars) or mice maintained at  $4^\circ\text{C}$  for 3 weeks (black bars). **(l, m)** Micrographs (magnification  $\times 20$ ) of iWAT from **(l)** control mice or **(m)** mice injected daily with 1 mg/kg CL316,243 for 8 days. **(n–v)** Transcript levels of **(n)** *Lbp*, **(o)** *Ucp1*, **(p)** *Prdm16*, **(q)** *Fgf21*, **(r)** *Ppargc1a*, **(s)** *Sirt3*, **(t)** *Slc2a4*, **(u)** *Pparg* and **(v)** *Adipoq* from control mice (white bars) or mice injected with CL316,243 (black bars). mRNA levels are normalised to 18S rRNA levels. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of six independent samples per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$



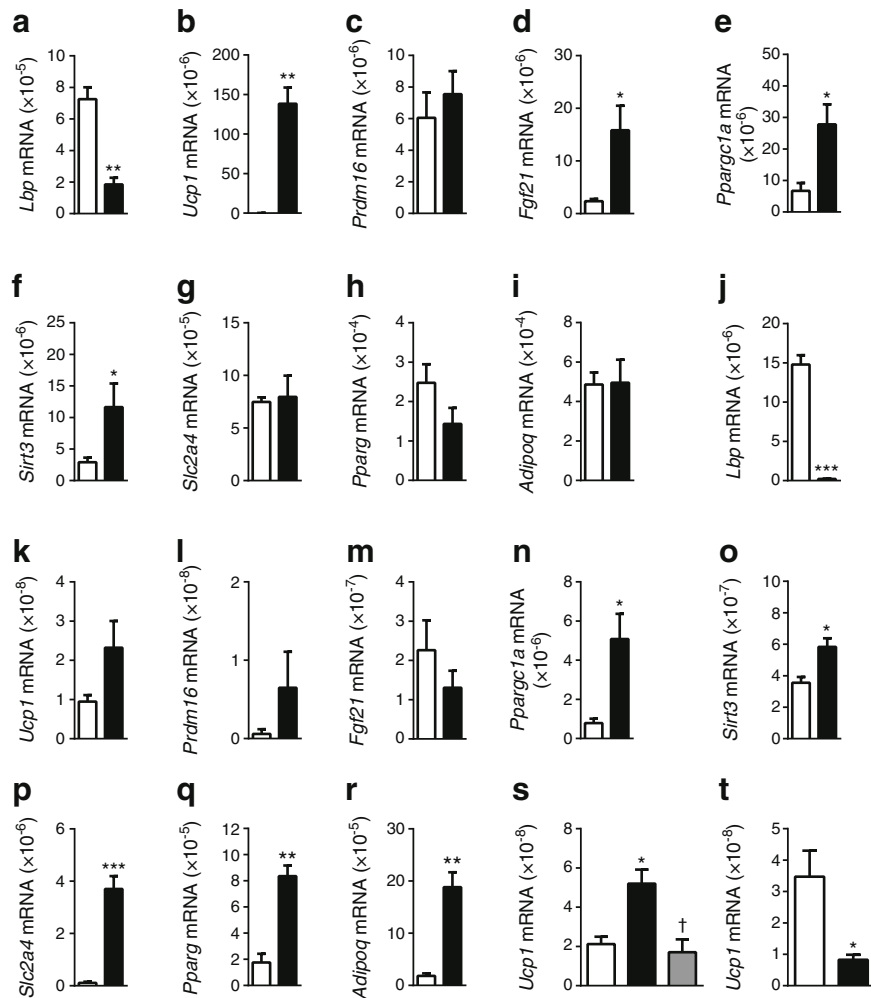
affecting the expression of the general adipogenesis-related genes *Slc2a4* (also known as *Glut4*), *Adiponectin* (*Adipoq*) and *Pparg* (Fig. 2g–i). These data confirm that negative regulation of LBP expression is associated with the adipocyte browning. Moreover, treatment of differentiated beige/brite adipocytes with noradrenaline repressed *Lbp* and induced *Ucp1* gene expression (ESM Fig. 3a,b); however, noradrenaline did not modify *Lbp* expression in brown adipocytes (ESM Fig. 3c).

To investigate whether LBP has a direct role in the browning process, we studied the effects of shRNA-mediated LBP knockdown in 3T3-L1 adipocytes. After 7 days of differentiation, shLBP exhibited increased mRNA levels of several thermogenesis-related genes, including *Ucp1*,

*Ppargc1a* and *Sirt3* (Fig. 2k–o). Treatment of shLBP cells with recombinant LBP rescued the induction of *Ucp1* mRNA expression induced by loss of *Lbp* (Fig. 2s). Moreover, shLBP adipocytes subjected to transwell co-culture with control adipocytes showed lower levels of *Ucp1* mRNA expression compared with those co-cultured with shLBP cells (Fig. 2t). Overall, these data suggest that the downregulation of *Lbp* represses browning in a cell-autonomous manner.

***Lbp*-null mice exhibit reduced body weight gain accompanied by an induction of the browning process in iWAT** To study the role of LBP in vivo, *Lbp*-null mice and WT littermate controls were fed standard chow (CTRL) or an





**Fig. 2** *Lbp* and the expression of browning-related genes are inversely regulated in a cell-autonomous manner. (a–i) Transcript levels of (a) *Lbp*, (b) *Ucp1*, (c) *Prdm16*, (d) *Fgf21*, (e) *Ppargc1a*, (f) *Sirt3*, (g) *Slc2a4*, (h) *Pparg* and (i) *Adipoq*, in WAT-derived primary white adipocytes (white bars) or rosiglitazone-induced beige/brite adipocytes (black bars). (j–r) Transcript levels of (j) *Lbp*, (k) *Ucp1*, (l) *Prdm16*, (m) *Fgf21*, (n) *Ppargc1a*, (o) *Sirt3*, (p) *Slc2a4*, (q) *Pparg* and (r) *Adipoq* in 3T3-L1 adipocytes transfected with a control shRNA (shControl; white bars) or an shRNA targeting LBP (black bars). (s) Transcript levels of

*Ucp1* in control 3T3-L1 adipocytes (white bars) or LBP-knockdown adipocytes untreated (black bar) or treated (grey bar) with 10 ng/ml LBP. (t) Transcript levels of *Ucp1* in LBP-knockdown 3T3-L1 adipocytes co-cultured with LBP-knockdown (white bar) or control 3T3-L1 adipocytes (black bar). mRNA levels are normalised to 18S rRNA levels. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of 4–7 independent samples per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs control † $p < 0.05$  for treated vs non-treated LBP-knockdown)

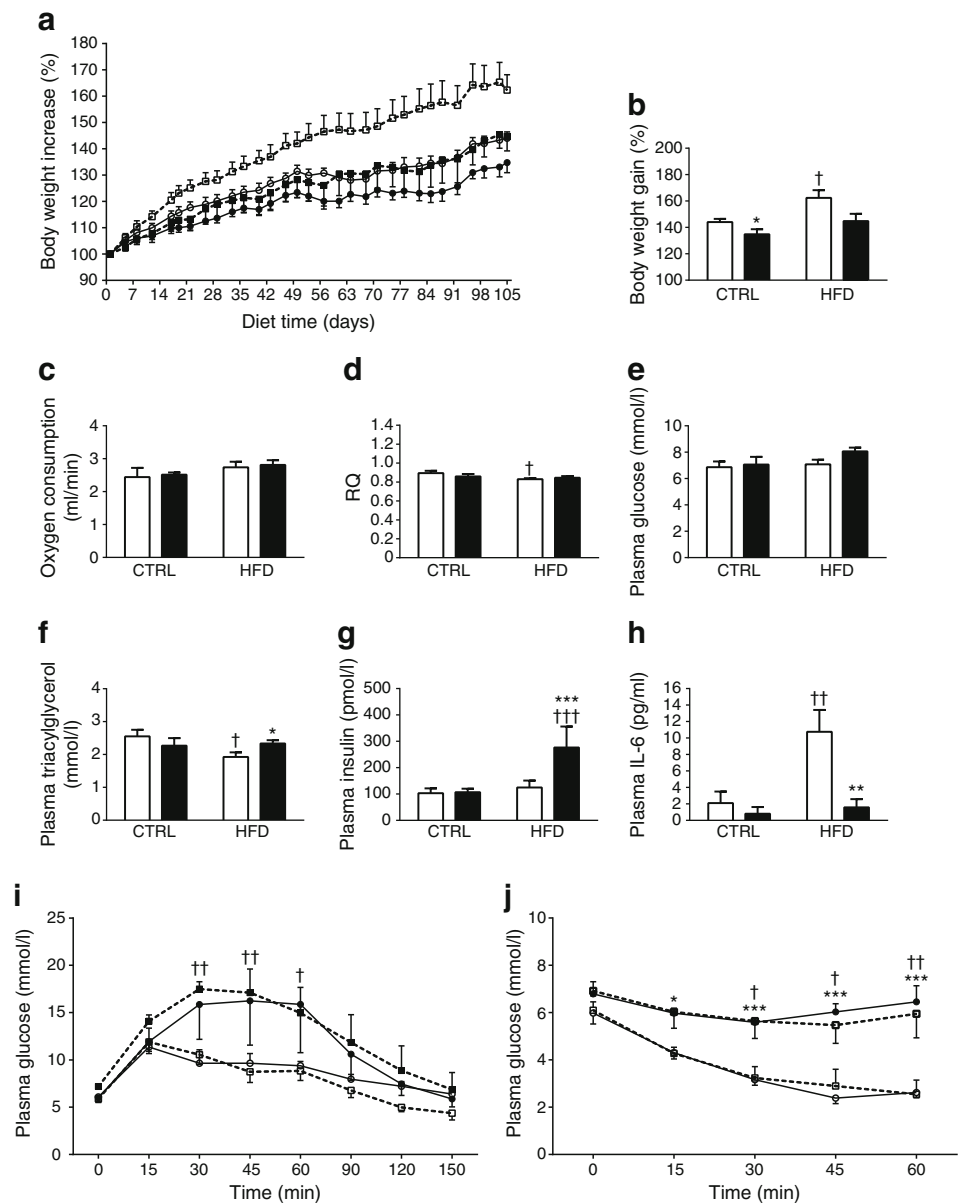
HFD for 15 weeks. At the start of the experiment (5-week-old mice), body weight was similar between WT and *Lbp*-null mice. The body weight of WT mice increased to 144% of the initial weight under standard feeding conditions and to 162% when fed an HFD (Fig. 3a,b). When fed a standard (CTRL) diet, the increase in body weight was significantly lower in *Lbp*-null mice (135%) than in WT mice on the same diet. On an HFD, the body weight of *Lbp*-null mice increased to only 145% of their initial weight; this increase was not significantly different from the body weight increase in *Lbp*-null mice on a standard diet. *Lbp*-null mice did not show significant changes in food intake relative to WT mice under standard diet ( $105 \pm 4\%$  kJ/day in *Lbp*-null vs WT) or HFD ( $112 \pm 8\%$  kJ/day in *Lbp*-null vs WT) conditions. Oxygen

consumption was not significantly different among the different experimental groups (Fig. 3c).

The RQ was significantly decreased in WT mice fed HFD (Fig. 3d). In *Lbp*-null mice, RQ did not change significantly in response to an HFD, indicating a somewhat altered metabolic flexibility to adapt to HFD as a consequence of *Lbp* inactivation.

*Lbp*-null mice showed no statistically significant alterations in blood glucose levels (Fig. 3e), whereas *Lbp*-null mice had higher plasma triacylglycerol levels when maintained on an HFD diet (Fig. 3f). Insulinaemia was strongly increased in *Lbp*-null mice relative to WT mice on an HFD (Fig. 3g). There were no differences in plasma NEFA, 3-hydroxybutyrate, leptin, adiponectin or resistin levels between WT and *Lbp*-null

**Fig. 3** *Lbp*-null mice have diminished body weight gain, with impaired glucose homeostasis. **(a)** Time course of mouse body weight, **(b)** final body weight gain, **(c)** oxygen consumption and **(d)** RQ. **(e–h)** Plasma levels of **(e)** glucose, **(f)** triacylglycerols, **(g)** insulin and **(h)** IL-6. White bars, WT mice; black bars, *Lbp*-null mice. **(i)** Glucose tolerance and **(j)** insulin tolerance tests in WT and *Lbp*-null mice after 15 weeks on a standard diet (CTRL) or HFD. White circles, WT mice, standard diet; White squares, WT mice, HFD; black circles, *Lbp*-null mice, standard diet; black squares, *Lbp*-null mice, HFD. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of 6–7 mice per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ , WT vs *LBP*-null mice; † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$  and ††† $p < 0.001$ , CTRL vs HFD



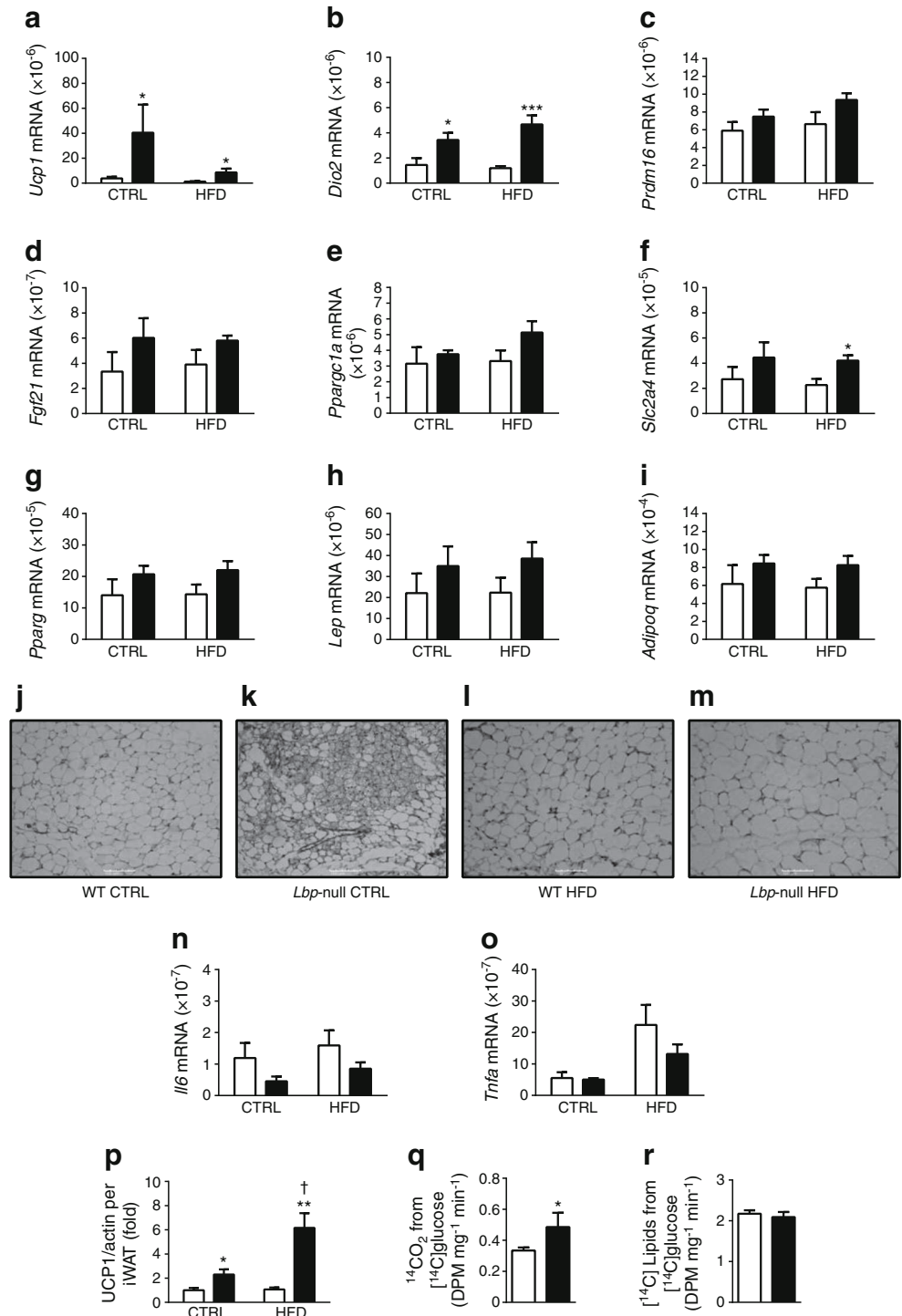
mice under CTRL or HFD conditions (ESM Table 2). Of the proinflammatory factors, HFD strongly induced circulating IL-6 levels in WT mice; this effect was totally ablated in *Lbp*-null mice (Fig. 3h). Consistent with the Balb genetic background of these mice, HFD did not affect glucose tolerance or the insulin response of WT mice, as determined by GTTs and ITTs (Fig. 3i,j) [22]. However, *Lbp*-null mice exhibited marked glucose intolerance and reduced insulin sensitivity on both a standard diet and HFD.

Under both standard diet and HFD conditions, *Lbp*-null mice showed a marked induction of the browning phenotype markers *Ucp1* and *Dio2* in iWAT (Fig. 4a,b). Other marker genes, including *Prdm16*, *Fgf21* and *Ppargc1a* (Fig. 4c–e), showed a similar trend that did not reach statistical significance between groups, although multifactorial

ANOVA analysis revealed a significant increase in *Fgf21* ( $p = 0.03$ ) for the *Lbp*-null factor. iWAT depots showed clusters of multivacuolar adipocytes (with beige/brite morphology) in *Lbp*-null mice, consistent with the gene expression data (Fig. 4j–m). Expression of genes involved in overall adipogenesis (*Pparg*, *Leptin* [*Lep*], and *Adipoq*) did not change (Fig. 4g–i), whereas multifactorial ANOVA analysis revealed a significant increase in *Slc2a4* ( $p = 0.04$ ) for the *Lbp*-null factor. The amount of UCP1 protein per iWAT depot was higher in *Lbp*-null mice than in WT mice under both standard diet and HFD conditions (Fig. 4p). Under conditions that promoted the highest browning, the amount of UCP1 protein in iWAT was around 8% of the levels observed in iBAT. Explants of iWAT from *Lbp*-null mice had an increased rate of glucose oxidation (Fig. 4q), but no change



**Fig. 4** *Lbp*-null mice exhibit induction of iWAT browning. (**a–i, n, o**) Transcript levels of (**a**) *Ucp1*, (**b**) *Dio2*, (**c**) *Prdm16*, (**d**) *Fgf21*, (**e**) *Ppargc1a*, (**f**) *Slc2a4*, (**g**) *Pparg*, (**h**) *Lep*, (**i**) *Adipoq*, (**n**) *Il6* and (**o**) *Tnfa* in iWAT from WT (white bars) and *Lbp*-null (black bars) mice fed a standard diet (CTRL) or an HFD for 15 weeks. (**j–m**) Micrographs (magnification  $\times 20$ ) of iWAT sections. (**p**) UCP1 protein per iWAT depot. (**q**) Glucose oxidation and (**r**) glucose incorporation into lipids in iWAT explants from WT (white bars) and *Lbp*-null (black bars) mice. mRNA levels are normalised to 18S rRNA levels. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of 4–6 independent samples per group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ , WT vs *Lbp*-null mice; † $p < 0.05$ , CTRL vs HFD. DPM, disintegrations per minute



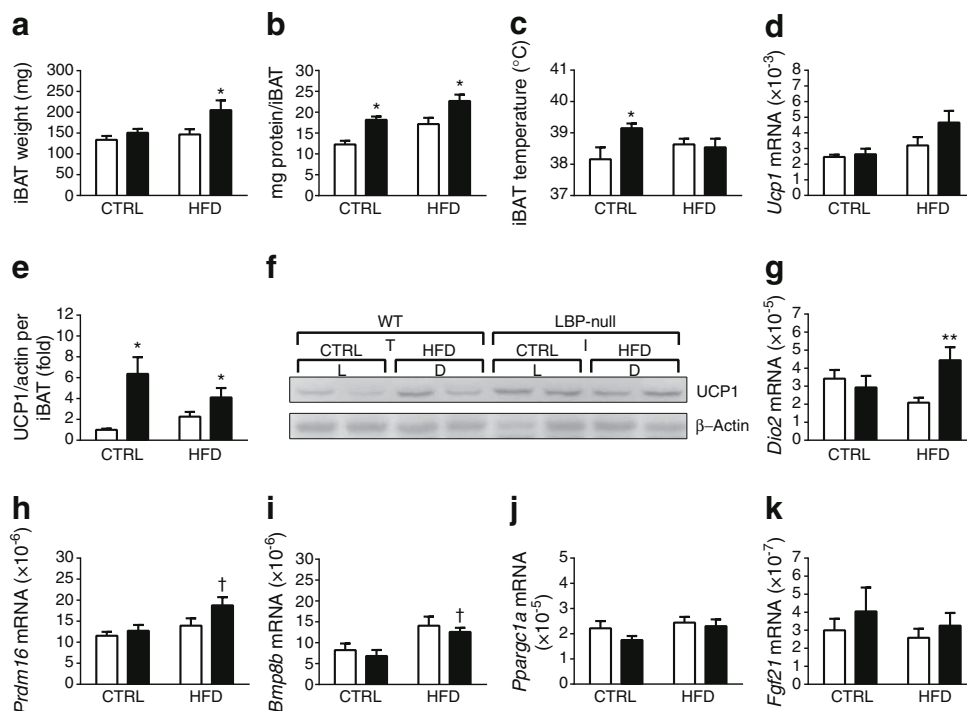
in the incorporation of glucose into lipids (Fig. 4r). This result indicates that oxidative pathways are enhanced in iWAT from *Lbp*-null mice, which is consistent with the molecular and morphological signs of browning in iWAT.

No evidence of significant browning due to *Lbp* gene ablation was detected in eWAT under any feeding condition, whether determined by gene expression analysis (with the

exception of *Dio2*; ESM Fig. 4) or microscopic examination (data not shown).

**iBAT in *Lbp*-null mice** iBAT weight tended to be higher in *Lbp*-null mice relative to controls (Fig. 5a) and total iBAT protein content was significantly higher in *Lbp*-null mice (Fig. 5b), indicating functional hypertrophy of iBAT in

**Fig. 5** iBAT in *Lbp*-null mice. **(a)** iBAT weight, **(b)** iBAT protein content and **(c)** surface temperature at the iBAT site in WT (white bars) and *Lbp*-null (black bars) mice fed a standard diet (CTRL) or an HFD. **(d)** *Ucp1* transcript levels and **(e)** UCP1 protein content per iBAT depot. **(f)** Representative immunoblot showing UCP1 protein levels in iBAT (40 µg protein/lane). **(g–k)** Transcript levels of **(g)** *Dio2*, **(h)** *Prdm16*, **(i)** *Bmp8b*, **(j)** *Ppargc1a* and **(k)** *Fgf21* in iBAT. mRNA levels are normalised to 18S rRNA levels. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of 4–6 independent samples per group. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , WT vs *Lbp*-null mice; † $p < 0.05$ , CTRL vs HFD



response to the lack of LBP. Consistent with this, the local temperature in the iBAT region was higher in *Lbp*-null mice than in WT mice, at least under standard diet conditions (Fig. 5c).

Total UCP1 per iBAT depot was increased in *Lbp*-null mice (Fig. 5e,f), although relative *Ucp1* transcript levels were not significantly altered (Fig. 5d). This scenario is consistent with a long-term BAT recruitment process [23]. Transcript levels for other thermogenesis-related genes showed no major changes due to LBP ablation, except for a significant induction of *Dio2* in the HFD group (Fig. 5g–k).

**Hepatic alterations in *Lbp*-null mice** Liver size and hepatic triacylglycerol content were unaltered in *Lbp*-null mice (data not shown). Expression of genes encoding gluconeogenesis-related enzymes (*G6pase* and *Pepck*) tended to be lower in *Lbp*-null mice (ESM Fig. 5a,b). The hepatic expression of *Srebp*, a master regulator of lipid synthesis, as well as *Fas*, *Scd1* and *Acaca*, was significantly reduced in *Lbp*-null mice under CTRL conditions (ESM Fig. 5c–f). *Il6* gene expression was undetectable under CTRL conditions in both WT and *Lbp*-null mice, but was strongly induced under HFD. This induction was impaired in *Lbp*-null mice, a profile that paralleled circulating IL-6 levels (ESM Fig. 5i).

**LBP expression negatively correlates with the expression of browning marker genes in human subcutaneous adipose tissue** We analysed the expression of LBP and browning marker genes in SAT and VAT biopsies from

morbidly obese patients. Anthropometrical and clinical variables included age ( $48.3 \pm 9.1$  years), BMI ( $43.8 \pm 6.9$  kg/m<sup>2</sup>), percentage fat mass ( $56.1 \pm 10.1\%$ ), fasting glucose ( $5.33 \pm 0.67$  mmol/l) and *M* value ( $23.5 \pm 13.3$  µmol kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>). We found significant negative correlations between LBP transcript levels and the levels of transcripts for the browning marker genes *UCP1*, *PRDM16*, *PPARGC1A* and *TMEM26* (the latter being a putative marker of beige/brite adipocytes [24]) in SAT (Table 1). No such correlation was found between LBP expression and general markers of WAT such as *PLIN1*, *LEP* or *DGAT1*. In VAT, LBP mRNA levels negatively correlated with *TMEM26* mRNA levels and positively correlated with *LEP* mRNA levels (Table 1).

**Table 1** Bivariate correlations between LBP gene expression and the expression of browning marker genes in SAT and VAT from obese individuals ( $n = 38$ )

Gene	SAT	VAT
<i>PRDM16</i>	-0.32*	-0.21
<i>PPARGC1A</i>	-0.51**	-0.28
<i>UCP1</i>	-0.35*	-0.08
<i>TMEM26</i>	-0.33*	-0.49**
<i>PLIN1</i>	-0.06	-0.22
<i>LEP</i>	0.21	0.55***
<i>DGAT1</i>	0.22	0.27

Data are Spearman's  $r$  coefficients

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$

## Discussion

In addition to its immunostimulatory functions [14], LBP has been identified as an adipokine associated with obesity-induced metabolic and proinflammatory disorders [15, 16]. The promotion of BAT activity and, especially, of WAT browning are active research areas that hold promise for strategies aimed at protecting against obesity and associated metabolic abnormalities (e.g. hyperglycaemia and hyperlipidaemia) [24, 25]. Here, we report that both cold exposure and chronic treatment with a  $\beta_3$ -adrenergic agonist (two validated models for inducing WAT browning [20, 26]) were associated with dramatic decreases in *Lbp* gene expression in iWAT. This phenomenon occurred in a cell-autonomous manner: *Lbp* expression was strongly repressed in cultures of adipocytes induced to acquire a beige/brite phenotype. Moreover, silencing of *Lbp* expression in adipocytes enhanced the expression of browning marker genes, whereas LBP treatment reversed this effect. As LBP is secreted by adipocytes, these data suggest that LBP may negatively regulate browning, apparently in an autocrine manner.

We observed that *Lbp*-null mice were protected against body weight increases, which is consistent with the relationship observed between obesity and *Lbp* expression in the adipose tissues of human patients and mouse models [15]. In rodents, the thermogenic activity in BAT accounts for a significant proportion of whole body energy expenditure [27]; therefore, the observed activation of BAT in *Lbp*-null mice may be involved in reducing weight gain. Moreover, although the estimated total thermogenic capacity of ‘browned’ WAT is much lower than that of BAT [23], browning of WAT is proposed to be relevant to protection against HFD-induced obesity [8, 9]. Our results indicate that a lack of LBP in mice strongly enhances the browning of WAT, thus indicating that the in vitro function of LBP as negative regulator of browning also occurs in vivo. These findings support the concept that LBP, possibly acting in an autocrine manner, negatively regulates the browning process. The negative correlation between *Lbp* expression and marker genes of browning in human adipose samples is consistent with this scenario. The signs of BAT activation in mice lacking LBP appear to contrast with the minor association of BAT activation with *Lbp* downregulation in iBAT. It is possible that the effects of LBP deficiency on body weight in mice occur through alterations in *Lbp* expression in other tissues (e.g. nervous system) that indirectly contribute to regulation of BAT activity, and that the cell-autonomous effects of LBP deficiency are minor in the context of the whole animal. Furthermore, the lack of an overt increase in oxygen consumption (despite activated BAT and WAT browning) and unchanged food intake in *Lbp*-null mice could be due to changes in these variables that are too small to be measurable

but have long-term consequences on body weight. In any case, these observations warrant further research to determine whether impaired absorption of food might be different in *Lbp*-null mice than in WT mice, given evidence for a role for LBP in gut biology [28]. In summary, the *Lbp*-null model supports a role for LBP in the browning process, but the pleiotropic phenotype in these mice (see below) precludes definitive conclusions on the impact of browning induction on whole-body energy balance.

The obesity resistance, promotion of browning and increased BAT activity observed in *Lbp*-null mice were accompanied by glucose intolerance and insulin insensitivity. Although seemingly unexpected, these findings can be viewed in relation to our current understanding that complex relationships exist between inflammatory pathways (*Lbp*-null mice also showed a decrease in systemic and local inflammatory markers, such as IL-6) and metabolic regulation. Numerous studies have demonstrated a positive association between serum LBP concentration and obesity-associated metabolic disturbances, including insulin resistance, in humans [29–33]. However, a discrepancy between circulating concentrations of innate immune system proteins in obese patients and the metabolic phenotype of the corresponding knockout mice has also been reported for lipocalin-2 [34, 35] and IL-6 [4, 36]. Other mouse models with loss of function of proinflammatory factors leading to impaired inflammation, such as the dominant-negative *Tnfa* transgenic mouse [37] and *Fsp27*-deficient mice [38], show reduced inflammation in adipose tissue associated with weight loss, but also insulin resistance. In fact, mice lacking LPS-binding capacity due to *Cd14* knockout show reduced proinflammatory responses to LPS, but with significantly impaired glucose tolerance [39]. Thus, although current concepts tend to support the hypothesis that adipose tissue expansion in obesity is associated with local inflammation, which contributes to insulin resistance, recent research indicates that a certain degree of inflammatory response is essential for healthy adipose tissue expansion [37]. Our findings suggest the possibility that total impairment of the LPS signalling pathway limits an appropriate inflammatory response, abolishing the improvement in glucose tolerance that might be expected as a consequence of protection against obesity.

In conclusion, LBP appears to be a negative regulator of WAT browning and possibly of BAT activation. This action of LBP may be relevant to its role in favouring obesity and fat accretion. However, a total lack of LBP, even if protective against obesity, does not result in a systemic healthy phenotype. The complexities of homeostatic vs deleterious roles of inflammatory pathways in metabolic regulation are highlighted in the mouse model of *Lbp* gene ablation. Fine-tuning LBP levels should be considered a part of any prospective use of this factor in promoting healthy metabolism.

**Funding** This work was partly supported by research grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (PI11–00214, PI12/02631, SAF2014–55725 and BFU2015–70454-REDT) and FONDOS FEDER. CIBEROBN Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Spain.

**Duality of interest** The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

**Contribution statement** AG-N, TQ-L and MC performed experiments in rodent models; JMM-N and JMF-R performed the studies involving human tissue; AG-N, TQ-L, MG and JMM-N performed the cell culture experiments; all authors contributed to the study design and participated in data analysis; AG-N and FV wrote the manuscript; all authors contributed to drafting the manuscript or revised it critically for intellectual content; and all authors gave final approval of the version to be published. FV is the guarantor of this work.

## References

- Erdmann J, Kallabis B, Oppel U, Sypchenko O, Wagenpfeil S, Schusdziaira V (2008) Development of hyperinsulinaemia and insulin resistance during the early stage of weight gain. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E568–E575
- Saito M (2013) Brown adipose tissue as a regulator of energy expenditure and body fat in humans. *Diabetes Metab J* 37:22–29
- Bartelt A, Bruns OT, Reimer R et al (2011) Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 17:200–205
- Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL et al (2013) Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 123:215–223
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J et al (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360:1518–1525
- Cypess AM, White AP, Vemochet C et al (2013) Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med* 19:635–639
- Young P, Arch JR, Ashwell M (1984) Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett* 167:10–14
- Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP (1998) Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest* 102:412–420
- Seale P, Conroe HM, Estall J et al (2011) Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* 121:96–105
- Bartelt A, Heeren J (2014) Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol* 10:24–36
- Nedergaard J, Cannon B (2014) The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab* 20:396–407
- Grube BJ, Cochane CG, Ye RD et al (1994) Lipopolysaccharide binding protein expression in primary human hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *J Biol Chem* 269:8477–8482
- Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM et al (1994) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 179:269–277
- Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ (1989) Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Biol Chem* 264:10867–10871
- Moreno-Navarrete JM, Escote X, Ortega F et al (2013) A role for adipocyte-derived lipopolysaccharide-binding protein in inflammation-and obesity-associated adipose tissue dysfunction. *Diabetologia* 56:2524–2537
- Moreno-Navarrete JM, Escote X, Ortega F et al (2015) Lipopolysaccharide binding protein is an adipokine involved in the resilience of the mouse adipocyte to inflammation. *Diabetologia* 58:2424–2434
- Aune UL, Ruiz L, Kajimura S (2013) Isolation and differentiation of stromal vascular cells to beige/brite cells. *J Vis Exp* 73:50191
- Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the Brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem* 276:1486–1493
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509
- Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG (2012) In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab* 15:480–491
- Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285:7153–7164
- Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH et al (2013) Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia* 56:1129–1139
- Nedergaard J, Cannon B (1831) UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim Biophys Acta* 2013:943–949
- Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L et al (2013) A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab* 17:798–805
- Lichtenbelt W, Kingma B, van der Lans A, Schellen L (2014) Cold exposure—an approach to increasing energy expenditure in humans. *Trends Endocrinol Metab* 25:165–167
- Lee P, Greenfield JR (2015) Non-pharmacological and pharmacological strategies of brown adipose tissue recruitment in humans. *Mol Cell Endocrinol* 418:184–190
- Cannon B, Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277–359
- Vreugdenhil AC, Snoek AM, Greve JW, Buurman WA (2000) Lipopolysaccharide binding protein is vectorially secreted and transported by cultured intestinal epithelial cells and is present in the intestinal mucus of mice. *J Immunol* 165:4561–4566
- Sun L, Yu Z, Ye X et al (2010) A marker of endotoxemia is associated with obesity and related metabolic disorders in apparently healthy Chinese. *Diabetes Care* 33:1925–1932
- Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serino M et al (2012) Circulating lipopolysaccharide-binding protein (LBP) as a marker of obesity-related insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 36:1442–1449
- Serrano M, Moreno-Navarrete JM, Puig J et al (2013) Serum lipopolysaccharide-binding protein as a marker of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 230:223–227
- Gonzalez-Quintela A, Alonso M, Campos J, Vizcaino L, Loidi L, Gude F (2013) Determinants of serum concentrations of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the adult population: the role of obesity. *PLoS One* 8:e54600
- Liu X, Lu L, Yao P et al (2014) Lipopolysaccharide binding protein, obesity status and incidence of metabolic syndrome: a prospective study among middle-aged and older Chinese. *Diabetologia* 57:1834–1841

34. Moreno-Navarrete JM, Manco M, Ibanez J et al (2010) Metabolic endotoxemia and saturated fat contribute to circulating NGAL concentrations in subjects with insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 34: 240–249
35. Guo H, Jin D, Zhang Y et al (2010) Lipocalin-2 deficiency impairs thermogenesis and potentiates diet-induced insulin resistance in mice. *Diabetes* 59:1376–1385
36. Matthews VB, Allen TL, Risis S et al (2010) Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia* 53:2431–2441
37. Wernstedt AI, Tao C, Morley TS et al (2014) Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell Metab* 20:103–118
38. Zhou L, Park SY, Xu L et al (2015) Insulin resistance and white adipose tissue inflammation are uncoupled in energetically challenged Fsp27-deficient mice. *Nat Commun* 6:5949
39. Young JL, Mora A, Cerny A et al (2012) CD14 deficiency impacts glucose homeostasis in mice through altered adrenal tone. *PLoS One* 7:e29688



## **RESUM DE RESULTATS I DISCUSSIÓ GLOBAL**

---





## RESUM DE RESULTATS I DISCUSSIÓ GLOBAL

---

### **L'activació termogènica reprimeix l'autofàgia en el teixit adipós marró**

El coneixement dels processos de regulació de la termogènesi al TAM és essencial en la comprensió dels mecanismes de control de la despesa energètica a l'organisme. Aquest coneixement té implicacions rellevants en relació a malalties metabòliques complexes com l'obesitat, diabetis o dislipèmies, especialment un cop ha emergit el fet que el TAM pot mantenir activitat significativa en humans adults. La inducció de la termogènesi engloba tota una sèrie de canvis adaptatius en el TAM, com l'activació de la lipòlisi i del programa transcripcional termogènic<sup>27</sup>. Aquest últim inclou la inducció de la transcripció d'Ucp1 entre d'altres gens implicats en el metabolisme oxidatiu i en la biogènesi mitocondrial. Els treballs realitzats en la present tesi doctoral han estat orientats en l'estudi de la implicació de l'autofàgia, especialment de la lipofàgia i la mitofàgia, en els processos adaptatius relacionats amb la funció termogènica que tenen lloc en el TAM.

En el moment d'iniciar aquesta tesi existien pocs estudis sobre el paper de l'autofàgia en la biologia del TAM, ja que els estudis publicats en aquell moment principalment havien centrat l'atenció en el paper de l'autofàgia en el TAB. S'havia descrit com l'autofàgia és un procés important durant l'adipogènesi i per a l'adquisició del fenotip beix en adipòcits blancs<sup>204,239-241</sup>. Arran d'aquestes últimes observacions vam hipotetitzar que l'autofàgia podria ser un procés important per a la funció termogènica en el TAM.

Per tal de determinar si canvis en l'autofàgia formaven part dels mecanismes adaptatius que tenen lloc durant l'activació termogènica, es van exposar ratolins al fred (24h) i posteriorment es va analitzar si hi havia hagut canvis en l'activitat autofàgica en el TAM. Paral·lelament a la inducció del programa transcripcional termogènic, es va observar que varis dels gens de la maquinària autofàgica es trobaven reprimits degut a l'estímul de fred. De fet, el posterior anàlisi de l'activitat o flux autofàgic ens va permetre comprovar que la inhibició transcripcional anava acompanyada d'una reducció de l'activitat autofàgica. Aquest fet també té lloc quan s'exposen adipòcits marrons en cultiu a noradrenalina (NE) o cAMP, el principal transductor intracel·lular de la senyal noradrenèrgica, essent doncs una resposta que succeeix de manera autònoma en els adipòcits marrons.

Anteriorment als nostres estudis, uns altres treballs havien descrit com la NE reprimeix l'activitat proteolítica en adipòcits marrons en cultiu<sup>244,246</sup>. D'aquesta manera, els nostres resultats completen aquestes observacions preliminars i corroboren el fet que l'autofàgia forma part de les vies de degradació inhibides per la NE. A més a més, les nostres observacions apunten a l'existència d'una component transcripcional associada a aquesta inhibició.

L'anàlisi de la implicació de les vies PKA i p38MAPK, les principals mitjanceres dels efectes transcripcionals de la NE i l'cAMP sobre el programa termogènic, va permetre determinar que ambdós processos es troben parcialment regulats per els mateixos sistemes de senyalització. En aquest sentit, es va poder determinar que els efectes transcripcionals observats estaven majoritàriament mitjançats per la via PKA però de manera independent a p38MAPK. Tot i així, les observacions derivades dels experiments realitzats van apuntar al fet que tant la via de la PKA com de la p38MAPK

podrien formar part dels mecanismes que mantenen controlats els nivells basals d'autofàgia, ja que la inhibició farmacològica d'aquestes vies en condicions basals fou suficient per promoure un increment en els nivells d'expressió (tant de transcrit com de proteïna) d'LC3B.

Tradicionalment, en el camp de l'estudi de l'autofàgia, la regulació transcripcional s'ha considerat un fet de poca importància, essent considerat un procés principalment regulat a través de modificacions post-transcripcionals i interaccions proteïna-proteïna. Durant el desenvolupament d'aquesta tesi i en paral·lel al nostre treball van aparèixer varies publicacions que posaven de manifest la importància de la regulació transcripcional en el control de l'autofàgia. Concretament, aquests treballs descriuen els canvis transcripcionals que tenen lloc durant els processos d'adaptació metabòlica al dejuni en el fetge, essent CREB un dels principals factors de transcripció que activen la resposta autofàgica<sup>202,283</sup>. Aquest fet és particularment interessant ja que de la inducció d'cAMP i d'activació de CREB tenen funcions fisiològiques oposades en fetge respecte el TAM: mentre que en el fetge activen la resposta al dejuni, en el TAM activen la resposta termogènica. Gràcies a aquests estudis en combinació amb els nostres treballs, es va poder comprovar que aquest fet ocorria d'igual manera per la regulació de l'autofàgia: mentre que en el fetge la via de l'cAMP l'activa, en el TAM la inhibeix. CREB podria ser el factor de transcripció responsable d'aquesta inhibició, ja que actua downstream de PKA, a diferència de la via p38MAPK que actua principalment a través d'ATF2. Caldrien estudis complementaris però, per poder confirmar aquesta hipòtesi. Cal mencionar que l'activació termogènica en l'adipòcit marró no és la única situació en la qual existeix un efecte inhibidor de l'cAMP i la PKA sobre l'activitat autofàgica. Per exemple, s'ha descrit com elevats nivells citoplasmàtics d'cAMP en cèl·lules neuronals poden inhibir l'autofàgia a través de mecanismes post-transcripcionals mitjançats per PKA<sup>284</sup>.

Com que el dejuni és un conegut mecanisme inhibidor de la termogènesi mentre que alhora és un dels principals inductors de l'autofàgia en hepatòcits, es van analitzar els efectes del dejuni en l'autofàgia en el TAM. L'anàlisi de la regulació transcripcional dels gens termogènics i autofàgics va confirmar la relació inversa entre l'activació termogènica i la inducció de l'autofàgia; en aquest cas el gens autofàgics es trobaren induïts, mentre que els termogènics reprimits. De fet, a través de l'ús de cultius primaris d'adipòcits marrons, es va poder comprovar l'existència d'una certa reciprocitat entre els dos processos: la inhibició farmacològica de l'autofàgia en adipòcits marrons en cultiu va revelar un increment dels nivells proteics d'UCP1 i de la respiració desacoblada. Així doncs és possible que la inhibició de l'autofàgia contribueixi a l'enriquiment dels components cel·lulars necessaris per la producció de calor.

Una de les observacions més interessants derivades d'aquest treballs fou la detecció d'activitat lipofàgica en els adipòcits marrons. A través de l'ús de tècniques de biologia molecular basades en la immunofluorescència i en la microscòpia confocal, es van poder detectar vesícules autofàgiques en adipòcits marrons diferenciats en cultiu, i així es va poder analitzar quina distribució subcel·lular mostraven i quins canvis es produïen degut a l'activació termogènica. Sorprenentment, es va detectar la presència de vesícules autofàgiques associades a les LD que, en alguns casos, arribaven a recobrir-ne la superfície. Quan es va procedir a tractar aquestes cèl·lules amb cAMP, es va poder observar com la quantitat de vesícules autofàgiques, tant les que estaven disperses en el citosol com les associades a les LD, es veia dràsticament reduïda. Per tal de corroborar si aquesta associació entre els

autofagosomes i les LD es devia a l'existència de lipofàgia es van analitzar imatges de microscòpia electrònica. Efectivament, es van poder detectar vesícules de degradació amb contingut lipídic en TAM de ratolins control, mentre que en el TAM de ratolins exposat al fred no se'n va poder detectar cap. Arran d'aquests resultats es va concloure que l'activació termogènica promou la inhibició de l'autofàgia que, en part, inclou la lipofàgia, un fenomen que encara no havia estat descrit en el TAM. Un dels aspectes que va ser objecte de discussió en aquest projecte fou la importància relativa de l'activitat lipofàgica respecte a la lipòlisi convencional, un fet que podria ser dependent del tipus cel·lular. En el cas dels hepatòcits, s'ha descrit com la lipofàgia és essencial en la gestió de les LD, essent un mecanisme protector davant l'esteatosi hepàtica<sup>212,285</sup>. Cal tenir en compte que l'acumulació de lípids en els hepatòcits (o en d'altres tipus cel·lulars no adiposos) pot generar lipotoxicitat i tenir conseqüències nocives<sup>286</sup>, mentre que, l'acumulació de lípids en els adipòcits és un fenomen intrínsecament relacionat amb la seva funció biològica. Així doncs cap la possibilitat que existeixin diferències entre la manera de gestionar el lípids citosòlics entre els diferents tipus cel·lulars. De fet, ja ha estat descrit com l'activitat de la HSL en el TAM és molt superior a la del fetge<sup>83</sup>. Tenint en compte això, l'activació de la lipòlisi convencional degut als estímuls termogènics en el TAM podria ser un mecanisme més eficient que la lipofàgia en l'obtenció d'àcids grassos, de manera que els mitocondris, que sovint es troben en contacte directe amb les LD, obtindrien els àcids grassos preferentment de la lipòlisi en detriment de la lipofàgia.

Els nostres estudis han estat centrats principalment en la degradació macroautofàgica, tot i així, no es pot descartar la implicació d'altres vies de degradació lisosomal en l'activitat termogènica. Recentment, en fetge, s'ha descrit com la degradació específica de perilipines per part de l'autofàgia mitjançada per xaperones (CMA) és important per a una correcta activació de la lipòlisi en el dejuni, permetent l'accés de les lipases a la LD<sup>287</sup>. A més a més, es coneix que davant determinats estímuls, la CMA i la macroautofàgia es troben regulades de manera oposada<sup>169,170</sup>. Estudis realitzats a principis del 1980, descriuen un increment en la quantitat de lisosomes degut al fred<sup>288</sup>, de manera que altres tipus de degradació lisosomal podrien estar associades a l'adaptació del TAM al fred, essent aquest un camp interessant per dur a terme futures investigacions.

Mentre en el nostre laboratori es duia a terme aquest projecte, es van publicar dos articles del grup d'investigació del Dr. Singh en relació a l'autofàgia en el TAM. En el primer d'ells, Singh et al. van descriure els efectes de la falta d'autofàgia en els processos de diferenciació i desenvolupament en el TAM. Utilitzant un model de ratolí autofàgic-deficient específicament en cèl·lules Myf5+ (precursors d'adipòcits marrons i cèl·lules musculars), els autors van descriure que el TAM d'aquest ratolí presenta una reducció en els nivells d'expressió de marcadors de diferenciació<sup>289</sup>. Aquesta observació anava en acord amb el que ja s'havia publicat anteriorment sobre l'autofàgia durant l'adipogènesi<sup>239-241</sup>. Per tal de discriminar els efectes de l'autofàgia en l'activitat del TAM dels efectes en la diferenciació, van utilitzar un sistema d'interferència transitòria (dies) de la capacitat autofàgica en el TAM de ratolins adults mitjançant adenovirus. En aquest últim model, la inhibició de l'autofàgia va promoure un increment en la  $\beta$ -oxidació. Aquest fet suporta les nostres observacions, ja que mostra com l'autofàgia té un rol diferent en l'activitat dels adipòcits marrons madurs respecte al que té durant la diferenciació i, a més a més mostra com podria tenir efectes negatius en la capacitat termogènica.

El segon article va ser publicat mentre nosaltres estàvem preparant el manuscrit que engloba els resultats descrits fins ara. Contràriament a les nostres observacions, els autors van descriure l'activació de l'autofàgia en el TAM de ratolins a temps molt curts d'exposició al fred (1 hora a 4°C), i van proposar l'existència d'una acció coordinada entre l'autofàgia i la lipòlisi mitjançada per la interacció entre LC3 i ATGL/HSL a la superfície de les LD<sup>290</sup>. Aquestes discrepàncies podrien ser integrades en un model on la lipofàgia, que nosaltres havíem observat en condicions basals, pogués actuar com a mecanisme d'acció ràpid mentre es recluten les lipases a les gotes lipídiques, en l'interval de temps durant el qual el TAM adquireix suficient capacitat oxidativa i substitueix la termogènesi associada a tremolor en la producció de calor. Posteriorment, la lipofàgia es veuria substituïda per una lipòlisi més eficient, mentre que la inhibició de l'autofàgia passaria a ser un mecanisme preferentment destinat a afavorir l'enriquiment de la maquinaria termogènica.

Aquesta hipòtesi va cobrar força arran de l'anàlisi de les dades obtingudes d'un RNAseq de mostres de TAM de ratolins mantinguts a termoneutralitat o exposats al fred (24h). En condicions de termoneutralitat el metabolisme basal és suficient per generar l'escalfor necessària per al manteniment de la temperatura corporal, de manera que el TAM s'inactiva adquirint algunes característiques de TAB, com la fusió de LD i la pèrdua de proteïna mitocondrial<sup>27,101,291</sup>. Quan es va analitzar l'expressió dels transcrits de gens autofàgics modificats degut al canvi de termoneutralitat a fred, es va observar que alguns dels gens autofàgics implicats en estadis avançats de la formació de l'autofagosoma i els gens Atg4, responsables del reciclatge de LC3, es trobaven induïts; mentre que, per contra, els gens implicats en la iniciació del procés es trobaven reprimits. Aquests canvis respecte el que s'havien observat quan s'havien exposat al fred ratolins adaptats a temperatures estàndard d'establiment (22°C), podrien ser deguts al fet que, en aquest cas, es partia de la inactivació total del teixit. Tot i així, la repressió de gens implicats en la iniciació del procés va suggerir que existia certa inhibició de l'autofàgia. De fet, una anàlisi més exhaustiva va revelar l'existència d'una inhibició molt potent dels gens implicats en mitofàgia Pink1 i Park2, essent Park2 el gen autofàgic que es trobava regulat a la baixa més intensament. Aquesta repressió de Park2 fou reproduïble en el cas de l'exposició al fred de ratolins adaptats a 22°C, podent comprovar que, a més a més, aquest fet es traduïa en una reducció dràstica dels nivells de proteïna Parkin. A partir d'aquest punt vam centrar els nostres esforços en elucidar el paper de Parkin (la proteïna del gen Park2) i de la mitofàgia en l'activació termogènica del TAM.

### **Parkin, un nou actor en el control de l'activitat del teixit adipós marró**

La mitofàgia és un mecanisme de control de qualitat destinat al manteniment d'una xarxa mitocondrial en bones condicions. S'ha descrit com és d'especial rellevància en el cas de cèl·lules amb alta capacitat oxidativa, com les cèl·lules musculars o les neurones<sup>292,293</sup>. En canvi, a l'inici d'aquesta tesi el paper de la mitofàgia en el TAM, un dels teixits amb més capacitat oxidativa, no havia estat descrit. En aquest projecte es va identificar Parkin, una de les principals proteïnes relacionades amb la mitofàgia, com a un nou factor implicat en el control de la capacitat termogènica del TAM.

Havent primerament determinat que Parkin és el factor mitofàgic més fortament reprimat en el TAM en resposta al fred, es va observar que, un cop ha tingut lloc el fenomen d'inducció del browning, el TAB subcutani també reprimeix Parkin davant l'estimulació termogènica. Per contra, en el TAB epididimal (menys propens al browning) els nivells de Parkin romanen estables. Així doncs, vam determinar que la

regulació termogènica de Parkin podria ser un fet exclusiu dels teixits adiposos termogènicament competents (marró i beix). Tot i que en aquest estudi no vam aprofundir en els fenòmens de browning, es va detectar una inducció de Parkin en el TAB subcutani durant les primeres 24h de fred, la qual cosa vam atribuir a als processos de diferenciació i reclutament dels nous adipòcits beix en el teixit. Aquesta idea es va veure reforçada per les dades obtingudes en l'anàlisi de Parkin durant la diferenciació dels adipòcits marrons. Es va poder comprovar com la inducció de Parkin forma part dels fenòmens que tenen lloc durant el procés de diferenciació, juntament amb l'adquisició del fenotip termogènic. Aquest fet és important ja que és possible que existeixi una relació entre l'increment de massa mitocondrial i la necessitat de la cèl·lula de disposar de mecanismes de control de qualitat d'aquests mitocondris. A més a més, s'ha descrit com Parkin pot actuar com a factor regulador de la pròpia biogènesi mitocondrial en neurones, on promou la degradació de PARIS, un inhibidor de PGC1 $\alpha$ <sup>275</sup>. Existeixen d'altres exemples de factors que s'indueixen durant la diferenciació de l'adipocit marró o beix i que en canvi es reprimeixen degut a l'activació termogènica, com és el cas de PPAR $\gamma$  o el receptor beta3-adenèrgic<sup>294,295</sup>; de manera que aquest no seria un fet singular o estrany.

Experimentalment, detectar fenòmens de mitofàgia, especialment en condicions fisiològiques, no és fàcil. De fet, la manera més comú d'analitzar els factors que influencien el procés de mitofàgia és l'ús de models cel·lulars modificats per la sobreexpressió de proteïnes mitofàgiques conjugades per l'emissió de fluorescència, juntament amb l'ús de desacobladors químics mitocondrials com el CCCP<sup>296</sup>. Aquest fet, tot i que permet fer un primer cribratge de l'activitat mitofàgica, no permet l'anàlisi en condicions similars a les que tenen lloc de manera fisiològica. De fet, la degradació intensa de proteïna mitocondrial en el TAM és un fenomen conegut quan el TAM s'adapta a condicions fisiològiques de baixa activitat termogènica, com són la gestació, l'alletament, la dieta hipocalòrica o la transició d'ambients freds a la termoneutralitat<sup>297</sup>. Utilitzant el model in vivo basat en la desaclimatació al fred, en que la inactivació del TAM implica la pèrdua massiva de proteïna mitocondrial<sup>291</sup>, vam poder determinar que la regulació de Parkin podria ser un punt de control en la degradació de mitocondris en el TAM. Vam descriure com la pèrdua de proteïna deguda a la inactivació del teixit va acompanyada de l'activació dels sistemes de degradació mitocondrial: increment en l'autofàgia, degradació de p62, increment de Parkin i estabilització de PINK1 a la membrana mitocondrial externa. PINK1 és la cinasa responsable del reclutament de Parkin als mitocondris que han de ser degradats. En condicions normals, un cop sintetitzada, PINK1 es transporta als mitocondris, on es degrada degut a l'acció de la proteasa PARL. En canvi, els estímuls inductors de la mitofàgia, com per exemple la despolarització de la membrana mitocondrial, promouen l'estabilització de PINK1 a la superfície mitocondrial, de manera que pot reclutar i activar Parkin. La translocació de Parkin al mitocondri promou el subseqüent reclutament dels receptors autofàgics, com p62, i la degradació per mitofàgia<sup>269</sup>. Així mateix, durant la desaclimatació, vam poder observar esdeveniments autofàgics i de degradació mitocondrial a través d'anàlisis de microscòpia electrònica. Així, vam poder evidenciar com existeix una inducció de la mitofàgia durant la desactivació del TAM, un fenomen que té lloc per l'activació del sistema PINK1-Parkin.

Vam poder detectar com, paradoxalment, PINK1 també s'estabilitza als mitocondris degut a la despolarització mitocondrial que té lloc durant l'activació termogènica. En aquest context, també té lloc la fragmentació de la xarxa mitocondrial, un mecanisme que incrementa l'oxidació d'àcids grassos lliures i l'activitat



termogènica<sup>256</sup>. Aquest és un fet rellevant, ja que la fragmentació mitocondrial també forma part dels mecanismes requerits per l'activitat mitofàgica<sup>252,259,264</sup>. En conjunt, aquests fets suggereixen que la repressió de Parkin podria ser un factor clau per la prevenció de la degradació de mitocondris durant l'activació termogènica, en un context on la resta de factors propicien la mitofàgia. Aquest mecanisme regulador es sumaria a la repressió de l'autofàgia (macroautofàgia) que ja havíem descrit.

Un anàlisi exhaustiu dels diversos factors involucrats en la regulació de Parkin durant l'activació termogènica va permetre confirmar l'acció repressora de la de la NE i l'cAMP sobre el promotor de Parkin, essent la repressió de la transcripció el principal mecanisme responsable de la caiguda dels nivells proteics de Parkin. La inducció de la termogènesi va acompanyada de l'activació de la lipòlisi i, els àcids grassos que se'n deriven poden actuar com a lligands dels factors de transcripció PPAR. En concret, PPAR $\alpha$  controla la transcripció de gens del catabolisme lipídic i també d'UCP1<sup>54</sup>. L'anàlisi de les vies de senyalització intracel·lulars associades a aquests dos processos va revelar que la repressió de Parkin durant la termogènesi ocorre de manera independent de les vies PKA-p38MAPK, però requereix d'una correcta activació de la lipòlisi. Això, sumat al fet que l'activació farmacològica de PPAR $\alpha$  (factor de transcripció depenent de derivats d'àcids grassos com a lligands) fou suficient per promoure la repressió de Parkin, va permetre identificar l'existència d'un mecanisme regulador de Parkin associat als sistemes de senyalització d'àcids grassos. Anteriorment, ja s'havia descrit la implicació de PPAR $\alpha$  en el control d'alguns gens autofàgics en el fetge. Concretament, PPAR $\alpha$  juntament amb CREB i TFEB, coordinen la transcripció dels gens autofàgics durant el dejuni<sup>202,283</sup>. D'altres vies activadores de la termogènesi relacionades amb senyalització per àcids grassos, com les dependents de de PUFA, també reprimeixen Parkin. Un exemple n'és la via del receptor GPR120, activada per àcids grassos omega-3 com l'àcid eicosapentanoic (EPA) o per l'agonista GW9508 (Quesada-López et al. dades no publicades)<sup>298</sup>. Cal tenir en compte que no es pot descartar però, que la via PKA tingui efectes colaterals en la regulació de Parkin derivats de la fosforilació de la HSL i la inducció de lipòlisi, ja que l'inhibidor de la PKA que es va usar en els experiments no va ser capaç d'alterar la lipòlisi i d'aquesta manera no ens va permetre confirmar aquest fet.

L'estudi dels efectes de la falta de Parkin usant un model animal modificat genèticament (Parkin-KO) va permetre confirmar que la repressió de Parkin té efectes positius sobre la funció termogènica en el TAM. Els ratolins Parkin-KO mostren un fenotip de sobreinducció de l'activitat termogènica, evidenciat per un increment en la producció de calor i en els nivells d'UCP1, i una sobreexpressió de varis gens termogènics. Aquest fet es tradueix en un menor pes corporal i baixa adipositat. A més a més FGF21 i IL6 es troben sobreinduits en els ratolins Parkin-KO en resposta al fred. FGF21 i IL6 són factors secretables involucrats en el paper autocrí i paracrí del TAM<sup>128</sup>. Determinar la participació d'aquests factors en el fenotip dels ratolins Parkin-KO requereix futures investigacions. Cal mencionar que el model utilitzat és un model Parkin-KO general, generat inicialment per tal d'investigar els efectes de la falta de Parkin que desencadenen la malaltia de Parkinson. Tot i que va resultar no ser un bon model per aquesta malaltia, ja que els animals Parkin-KO no presenten fenotip parkinsonià<sup>277,299</sup>, no es poden descartar alteracions centrals o en d'altres teixits.

Seguidament, vam poder confirmar els efectes metabòlics beneficiosos enfront l'obesitat de la sobreactivació del TAM degut a la falta de Parkin. Els ratolins Parkin-KO van mostrar ser resistents al guany de pes durant una HFD mantenint, a més a



més, la sensibilitat a la insulina. Aquestes observacions estan en acord amb un treball publicat amb anterioritat a aquest projecte, en el qual els autors ja descrivien efectes protectors de la falta de Parkin en front l'obesitat<sup>281</sup>. En aquest treball els autors descrivien com l'activitat de Parkin determina l'estabilització del transportador de lípids CD36, influenciant la captació de lípids en hepatòcits i durant la diferenciació en adipòcits blancs. En el nostre cas, vam aprofitar el fet que el TAM és el principal teixit responsable de la caiguda dels nivells de triglicèrids circulants en l'exposició al fred<sup>300</sup> per descartar alteracions en la captació de lípids. Quan es van mesurar els canvis en nivells de triglicèrids circulants en resposta al fred no es van detectar canvis entre genotips (dades no mostrades), de manera que el fet que el TAM dels ratolins Parkin-KO mostri una reducció en els nivells de lípids, ho atribuïm principalment a l'activitat termogènica.

Tal i com apuntaven les observacions que havíem realitzat amb anterioritat, la importància de l'autofàgia i de la mitofàgia per a l'activitat termogènica es pot estendre als altres teixits termogènicaament competents. Recentment, Kajimura i col·laboradors han descrit com l'autofàgia forma part dels fenòmens de transició que permeten la readquisició del fenotip "blanc" del teixit adipós beix subcutani<sup>301</sup>. Tot i que en aquest treball no s'analitza la implicació del sistema PINK1-Parkin, un altre article publicat en els últims mesos ha confirmat algunes de les observacions que havíem realitzat en el cas de la regulació de Parkin en el teixit adipós beix. Taylor i col·laboradors descriuen com Parkin és un factor que s'indueix en la diferenciació dels adipòcits blancs i que es reprimeix durant l'activació termogènica del teixit adipós beix subcutani<sup>302</sup>.

Part dels efectes potenciadors de la termogènesi per part de la falta d'activitat autofàgica, i especialment mitofàgica, podrien estar mitjançats per efectes colaterals a l'acumulació de p62. S'ha descrit com p62 (que s'acumula quan l'autofàgia s'inhibeix) sembla tenir efectes independents de la mitofàgia, essent un factor important per la correcta activitat del TAM possiblement actuant a través de mecanismes transcripcionals<sup>303</sup>. De la mateixa manera, no es poden descartar efectes de Parkin independents de la mitofàgia. Existeixen evidències de la relació de Parkin i el control del metabolisme de la glucosa<sup>278,279</sup>. La influència de Parkin en la preferència d'ús de substrats oxidatius en el TAM seria un camp interessant per dur a terme futures investigacions.

En resum, els resultats obtinguts fins al moment ens han permès determinar que l'autofàgia i, especialment, la mitofàgia, actuen com a reguladors negatius de l'activitat termogènica del TAM. En aquest sentit Parkin, com a factor regulador de la mitofàgia downstream de PINK1, actua com a regulador negatiu de la capacitat termogènica, participant en la inactivació del teixit durant la desaclimatació al fred. Durant l'activació termogènica en canvi, la repressió de Parkin seria un sistema per prevenir la mitofàgia en un context de despolarització i fragmentació mitocondrial. En conseqüència, la falta de Parkin resulta en una sobreinducció de l'activitat termogènica del TAM que confereix una protecció davant l'obesitat i la resistència a l'insulina

### **Factors hormonals i dietaris capaços d'influenciar l'activitat del TAM**

Tot i que la present tesi es centra en els efectes dels sistemes autofàgics principalment regulats per el fred i les catecolamines sintetitzades pel sistema nerviós simpàtic, la revisió de la bibliografia relacionada amb els diversos mecanismes

reguladors de la termogènesi ha format part del procés de formació doctoral. Part d'aquesta feina realitzada ha pogut ser publicada en una revisió que versa sobre la senyalització hormonal i nutricional en el control de l'activació i el reclutament del teixit adipós marró i beix, realitzada en col·laboració amb d'altres autors. La identificació de factors hormonals i dietaris capaços d'influenciar l'activitat del TAM té un especial interès biomèdic en el desenvolupament d'estratègies farmacològiques per el tractament de l'obesitat i les malalties metabòliques que se'n deriven. En el nostre laboratori, s'han dut a terme diversos projectes científics destinats precisament a la identificació d'alguns d'aquests factors. Juntament amb el treballs que formen el nucli temàtic de la present tesi doctoral, he participat com a col·laboradora en projectes la temàtica dels quals està relacionada amb la regulació de la capacitat termogènica del teixit adipós marró i beix per part de factors hormonals i dietaris. La meua participació s'ha centrat en la realització de cultius primaris d'adipòcits entre d'altres procediments analítics, i en la participació en la interpretació global de les dades. Aquests treballs han resultat en dues publicacions. Una aportació a remarcar ha estat la que es discuteix de manera breu a continuació; mentre que una segona aportació es troba adjunta, annex.

### **La proteïna d'unió a lipopolisacàrid és un regulador negatiu del browning del teixit adipós en ratolins i en humans**

La proteïna d'unió a lipopolisacàrid (LBP) és una citocina proinflamàtòria de fase aguda secretada majoritàriament per el fetge, tot i que també pot ser secretada per els teixits adiposos com a citocina proinflamàtòria. De fet, la producció d'LBP per part del TAB s'ha relacionat amb l'estatus d'inflamació del teixit que ocorre en l'obesitat<sup>304,305</sup>. Una de les col·laboracions dutes a terme durant la present tesi va ser la participació en l'estudi de la influència de la secreció d'LBP en la capacitat d'inducció del browning del TAB. En l'estudi realitzat en el nostre laboratori per Gavalda-Navarro i col·laboradors, es va descriure la funció reguladora negativa de la secreció d'LBP per part dels adipòcits en la inducció del browning. En primer lloc es va descriure com la disminució en l'expressió de LBP en els adipòcits en condicions d'activació termogènica sostinguda, possibilita els fenòmens de browning. Seguidament, es va comprovar com aquestes accions d'LBP tenen lloc de manera autocrina i paracrina en el TAB. Una de les observacions derivades d'aquests treball fou que la falta d'expressió d'LBP en ratolins modificats genèticament, promou un estatus d'intolerància a la glucosa i de resistència a la insulina. Aquesta observació està en acord amb estudis publicats anteriorment on es descriu la importància del manteniment d'una correcta resposta inflamàtòria per al manteniment de la homeòstasi i funció del teixit adipós<sup>306</sup>. A més a més, es van poder obtenir mostres humanes de teixit adipós subcutani i visceral d'una cohort amb obesitat mòrbida. Les anàlisis d'aquestes mostres de pacients van permetre descriure com l'expressió de LBP correlaciona negativament amb l'expressió de marcadors de browning en TAB subcutani en humans. Així doncs, en aquest treball es va poder identificar l'LBP com un regulador negatiu del procés de browning, essent aquest un dels factors que probablement contribueixi a les accions promotores de l'obesitat.

## **CONCLUSIONS**

---



## CONCLUSIONS

---

- L'activació termogènica del teixit adipós marró causa una repressió en l'autofàgia al teixit.
- Aquest efecte es produeix en els adipòcits marrons en resposta al estímul noradrenèrgic mitjançant de l'activació termogènica.
- La repressió de l'autofàgia potencia l'activitat termogènica dels adipòcits marrons.
- L'activació termogènica va associada al repressió de processos de lipofàgia.
- Parkin es un dels gens relacionats amb l'autofàgia més fortament reprimits per l'activació termogènica del teixit adipós marró.
- La repressió del gen Parkin en els adipòcits marrons implica mecanismes dependents de la lipòlisi dels dipòsits lipídics cel·lulars
- La manca de Parkin en ratolins provoca processos de sobre-activació de l'activitat del teixit adipós marró
- El model experimental de desaclimatació al fred provoca la inducció dels nivells de Parkin en associació a un augment en la mitofàgia
- En resum, els processos d'autofàgia juguen un rol important en la regulació termogènica dels teixit adipós marró i actors com Parkin hi juguen un paper rellevant.



## **BIBLIOGRAFIA**

---





## BIBLIOGRAFIA

---

- 1 Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. What we talk about when we talk about fat. *Cell* **156**, 20-44, doi:10.1016/j.cell.2013.12.012 (2014).
- 2 Cinti, S. *The adipose organ*. (Editrice Kurtis (Milano), 1999).
- 3 Hardouin, P., Rharass, T. & Lucas, S. Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Frontiers in endocrinology* **7**, 85, doi:10.3389/fendo.2016.00085 (2016).
- 4 Giral, M. & Villarroja, F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* **154**, 2992-3000, doi:10.1210/en.2013-1403 (2013).
- 5 Ishibashi, J. & Seale, P. Medicine. Beige can be slimming. *Science* **328**, 1113-1114, doi:10.1126/science.1190816 (2010).
- 6 Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366-376, doi:10.1016/j.cell.2012.05.016 (2012).
- 7 Peirce, V., Carobbio, S. & Vidal-Puig, A. The different shades of fat. *Nature* **510**, 76-83, doi:10.1038/nature13477 (2014).
- 8 Walden, T. B., Hansen, I. R., Timmons, J. A., Cannon, B. & Nedergaard, J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **302**, E19-31, doi:10.1152/ajpendo.00249.2011 (2012).
- 9 Scheller, E. L., Cawthorn, W. P., Burr, A. A., Horowitz, M. C. & MacDougald, O. A. Marrow Adipose Tissue: Trimming the Fat. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **27**, 392-403, doi:10.1016/j.tem.2016.03.016 (2016).
- 10 Cinti, S. Anatomy of the adipose organ. *Eating and weight disorders : EWD* **5**, 132-142 (2000).
- 11 Gesta, S. *et al.* Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6676-6681, doi:10.1073/pnas.0601752103 (2006).
- 12 Amengual-Cladera, E., Llado, I., Proenza, A. M. & Gianotti, M. High-fat diet feeding induces a depot-dependent response on the pro-inflammatory state and mitochondrial function of gonadal white adipose tissue. *The British journal of nutrition* **109**, 413-424, doi:10.1017/S0007114512001171 (2013).
- 13 Arner, P. Regional adiposity in man. *The Journal of endocrinology* **155**, 191-192 (1997).
- 14 Nadal-Casellas, A., Bauza-Thorbrugge, M., Proenza, A. M., Gianotti, M. & Llado, I. Sex-dependent differences in rat brown adipose tissue mitochondrial biogenesis and insulin signaling parameters in response to an obesogenic diet. *Molecular and cellular biochemistry* **373**, 125-135, doi:10.1007/s11010-012-1481-x (2013).
- 15 Sacks, H. & Symonds, M. E. Anatomical locations of human brown adipose tissue: functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **62**, 1783-1790, doi:10.2337/db12-1430 (2013).
- 16 Hany, T. F. *et al.* Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **29**, 1393-1398, doi:10.1007/s00259-002-0902-6 (2002).
- 17 Nedergaard, J., Bengtsson, T. & Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **293**, E444-452, doi:10.1152/ajpendo.00691.2006 (2007).
- 18 Cypess, A. M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* **360**, 1509-1517, doi:10.1056/NEJMoa0810780 (2009).
- 19 van Marken Lichtenbelt, W. D. *et al.* Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine* **360**, 1500-1508, doi:10.1056/NEJMoa0808718 (2009).
- 20 Virtanen, K. A. *et al.* Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England journal of medicine* **360**, 1518-1525, doi:10.1056/NEJMoa0808949 (2009).
- 21 Zingaretti, M. C. *et al.* The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB journal : official*

- publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **23**, 3113-3120, doi:10.1096/fj.09-133546 (2009).
- 22 Cypess, A. M. *et al.* Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nature medicine* **19**, 635-639, doi:10.1038/nm.3112 (2013).
  - 23 Sharp, L. Z. *et al.* Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PloS one* **7**, e49452, doi:10.1371/journal.pone.0049452 (2012).
  - 24 Saito, M. *et al.* High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **58**, 1526-1531, doi:10.2337/db09-0530 (2009).
  - 25 Symonds, M. E. *et al.* Thermal imaging to assess age-related changes of skin temperature within the supraclavicular region co-locating with brown adipose tissue in healthy children. *The Journal of pediatrics* **161**, 892-898, doi:10.1016/j.jpeds.2012.04.056 (2012).
  - 26 Cristancho, A. G. & Lazar, M. A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 722-734, doi:10.1038/nrm3198 (2011).
  - 27 Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews* **84**, 277-359, doi:10.1152/physrev.00015.2003 (2004).
  - 28 Symonds, M. E., Pope, M. & Budge, H. The Ontogeny of Brown Adipose Tissue. *Annual review of nutrition* **35**, 295-320, doi:10.1146/annurev-nutr-071813-105330 (2015).
  - 29 Sanchez-Gurmaches, J. & Guertin, D. A. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nature communications* **5**, 4099, doi:10.1038/ncomms5099 (2014).
  - 30 Sanchez-Gurmaches, J. *et al.* PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell metabolism* **16**, 348-362, doi:10.1016/j.cmet.2012.08.003 (2012).
  - 31 Lefterova, M. I. & Lazar, M. A. New developments in adipogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **20**, 107-114, doi:10.1016/j.tem.2008.11.005 (2009).
  - 32 Takada, I., Kouzmenko, A. P. & Kato, S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nature reviews. Rheumatology* **5**, 442-447, doi:10.1038/nrrheum.2009.137 (2009).
  - 33 Zamani, N. & Brown, C. W. Emerging roles for the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in regulating adiposity and energy expenditure. *Endocrine reviews* **32**, 387-403, doi:10.1210/er.2010-0018 (2011).
  - 34 Skillington, J., Choy, L. & Derynck, R. Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. *The Journal of cell biology* **159**, 135-146, doi:10.1083/jcb.200204060 (2002).
  - 35 Sottile, V. & Seuwen, K. Bone morphogenetic protein-2 stimulates adipogenic differentiation of mesenchymal precursor cells in synergy with BRL 49653 (rosiglitazone). *FEBS letters* **475**, 201-204 (2000).
  - 36 Kuo, M. M. *et al.* BMP-9 as a potent brown adipogenic inducer with anti-obesity capacity. *Biomaterials* **35**, 3172-3179, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.12.063 (2014).
  - 37 Tseng, Y. H. *et al.* New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* **454**, 1000-1004, doi:10.1038/nature07221 (2008).
  - 38 Zhang, J. W., Klemm, D. J., Vinson, C. & Lane, M. D. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *The Journal of biological chemistry* **279**, 4471-4478, doi:10.1074/jbc.M311327200 (2004).
  - 39 Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T. & Akira, S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *The EMBO journal* **16**, 7432-7443, doi:10.1093/emboj/16.24.7432 (1997).
  - 40 Tang, Q. Q., Zhang, J. W. & Daniel Lane, M. Sequential gene promoter interactions of C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* **319**, 235-239, doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.176 (2004).

- 41 Wu, Z. *et al.* Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Molecular cell* **3**, 151-158 (1999).
- 42 Tontonoz, P. & Spiegelman, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annual review of biochemistry* **77**, 289-312, doi:10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829 (2008).
- 43 Guan, H. P., Ishizuka, T., Chui, P. C., Lehrke, M. & Lazar, M. A. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes & development* **19**, 453-461, doi:10.1101/gad.1263305 (2005).
- 44 Kiskinis, E. *et al.* RIP140 represses the "brown-in-white" adipocyte program including a futile cycle of triacylglycerol breakdown and synthesis. *Mol Endocrinol* **28**, 344-356, doi:10.1210/me.2013-1254 (2014).
- 45 Hallberg, M. *et al.* A functional interaction between RIP140 and PGC-1alpha regulates the expression of the lipid droplet protein CIDEA. *Molecular and cellular biology* **28**, 6785-6795, doi:10.1128/MCB.00504-08 (2008).
- 46 Klemm, D. J. *et al.* Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 28430-28435, doi:10.1074/jbc.M103382200 (2001).
- 47 Student, A. K., Hsu, R. Y. & Lane, M. D. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *The Journal of biological chemistry* **255**, 4745-4750 (1980).
- 48 Carmona, M. C. *et al.* Mitochondrial biogenesis and thyroid status maturation in brown fat require CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *The Journal of biological chemistry* **277**, 21489-21498, doi:10.1074/jbc.M201710200 (2002).
- 49 Seale, P. *et al.* Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell metabolism* **6**, 38-54, doi:10.1016/j.cmet.2007.06.001 (2007).
- 50 Ishibashi, J. & Seale, P. Functions of Prdm16 in thermogenic fat cells. *Temperature (Austin)* **2**, 65-72, doi:10.4161/23328940.2014.974444 (2015).
- 51 Seale, P. *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454**, 961-967, doi:10.1038/nature07182 (2008).
- 52 Harms, M. J. *et al.* Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell metabolism* **19**, 593-604, doi:10.1016/j.cmet.2014.03.007 (2014).
- 53 Kajimura, S. *et al.* Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* **460**, 1154-1158, doi:10.1038/nature08262 (2009).
- 54 Barbera, M. J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *The Journal of biological chemistry* **276**, 1486-1493, doi:10.1074/jbc.M006246200 (2001).
- 55 Hondares, E. *et al.* Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. *Endocrinology* **147**, 2829-2838, doi:10.1210/en.2006-0070 (2006).
- 56 Villarroya, F., Iglesias, R. & Giral, M. PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression. *PPAR research* **2007**, 74364, doi:10.1155/2007/74364 (2007).
- 57 Puigserver, P. *et al.* A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839 (1998).
- 58 Ruas, J. L. *et al.* A PGC-1alpha isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell* **151**, 1319-1331, doi:10.1016/j.cell.2012.10.050 (2012).
- 59 Uldry, M. *et al.* Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell metabolism* **3**, 333-341, doi:10.1016/j.cmet.2006.04.002 (2006).
- 60 Scime, A. *et al.* Rb and p107 regulate preadipocyte differentiation into white versus brown fat through repression of PGC-1alpha. *Cell metabolism* **2**, 283-295, doi:10.1016/j.cmet.2005.10.002 (2005).

- 61 Cao, W. *et al.* p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Molecular and cellular biology* **24**, 3057-3067 (2004).
- 62 Cao, W., Medvedev, A. V., Daniel, K. W. & Collins, S. beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *The Journal of biological chemistry* **276**, 27077-27082, doi:10.1074/jbc.M101049200 (2001).
- 63 Giralt, A. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha controls transcription of the Sirt3 gene, an essential component of the thermogenic brown adipocyte phenotype. *The Journal of biological chemistry* **286**, 16958-16966, doi:10.1074/jbc.M110.202390 (2011).
- 64 Tiraby, C. *et al.* Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *The Journal of biological chemistry* **278**, 33370-33376, doi:10.1074/jbc.M305235200 (2003).
- 65 Wulf, A. *et al.* T3-mediated expression of PGC-1alpha via a far upstream located thyroid hormone response element. *Molecular and cellular endocrinology* **287**, 90-95, doi:10.1016/j.mce.2008.01.017 (2008).
- 66 Young, P., Arch, J. R. & Ashwell, M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS letters* **167**, 10-14 (1984).
- 67 Cinti, S. Reversible physiological transdifferentiation in the adipose organ. *The Proceedings of the Nutrition Society* **68**, 340-349, doi:10.1017/S0029665109990140 (2009).
- 68 Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K. & Scherer, P. E. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature medicine* **19**, 1338-1344, doi:10.1038/nm.3324 (2013).
- 69 Wang, W. & Seale, P. Control of brown and beige fat development. *Nature reviews. Molecular cell biology* **17**, 691-702, doi:10.1038/nrm.2016.96 (2016).
- 70 Harms, M. & Seale, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature medicine* **19**, 1252-1263, doi:10.1038/nm.3361 (2013).
- 71 Elabd, C. *et al.* Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells* **27**, 2753-2760, doi:10.1002/stem.200 (2009).
- 72 Gburcik, V., Cawthorn, W. P., Nedergaard, J., Timmons, J. A. & Cannon, B. An essential role for Tbx15 in the differentiation of brown and "brite" but not white adipocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **303**, E1053-1060, doi:10.1152/ajpendo.00104.2012 (2012).
- 73 Shao, M. *et al.* Zfp423 Maintains White Adipocyte Identity through Suppression of the Beige Cell Thermogenic Gene Program. *Cell metabolism* **23**, 1167-1184, doi:10.1016/j.cmet.2016.04.023 (2016).
- 74 Zafrir, B. Brown adipose tissue: research milestones of a potential player in human energy balance and obesity. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* **45**, 774-785, doi:10.1055/s-0033-1348264 (2013).
- 75 Goldberg, I. J., Eckel, R. H. & Abumrad, N. A. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *Journal of lipid research* **50 Suppl**, S86-90, doi:10.1194/jlr.R800085-JLR200 (2009).
- 76 Strable, M. S. & Ntambi, J. M. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **45**, 199-214, doi:10.3109/10409231003667500 (2010).
- 77 Brasaemle, D. L. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of lipid research* **48**, 2547-2559, doi:10.1194/jlr.R700014-JLR200 (2007).
- 78 Barneda, D., Frontini, A., Cinti, S. & Christian, M. Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the "browning" of white adipose tissues. *Biochimica et biophysica acta* **1831**, 924-933, doi:10.1016/j.bbalip.2013.01.015 (2013).
- 79 Shimizu, T. & Yokotani, K. Acute cold exposure-induced down-regulation of CIDEA, cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector A, in rat interscapular brown adipose tissue



by sympathetically activated beta3-adrenoreceptors. *Biochemical and biophysical research communications* **387**, 294-299, doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.147 (2009).

- 80 Kersten, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports* **2**, 282-286, doi:10.1093/embo-reports/kve071 (2001).
- 81 Fruhbeck, G., Mendez-Gimenez, L., Fernandez-Formoso, J. A., Fernandez, S. & Rodriguez, A. Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutrition research reviews* **27**, 63-93, doi:10.1017/S095442241400002X (2014).
- 82 Sztalryd, C. *et al.* Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *The Journal of cell biology* **161**, 1093-1103, doi:10.1083/jcb.200210169 (2003).
- 83 Zechner, R. *et al.* FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell metabolism* **15**, 279-291, doi:10.1016/j.cmet.2011.12.018 (2012).
- 84 Friedman, J. M. & Halaas, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763-770, doi:10.1038/27376 (1998).
- 85 Hu, E., Liang, P. & Spiegelman, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *The Journal of biological chemistry* **271**, 10697-10703 (1996).
- 86 Steinberg, G. R. *et al.* Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **286**, E57-63, doi:10.1152/ajpendo.00302.2003 (2004).
- 87 Qiao, L. *et al.* Adiponectin reduces thermogenesis by inhibiting brown adipose tissue activation in mice. *Diabetologia* **57**, 1027-1036, doi:10.1007/s00125-014-3180-5 (2014).
- 88 Li, S., Shin, H. J., Ding, E. L. & van Dam, R. M. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Jama* **302**, 179-188, doi:10.1001/jama.2009.976 (2009).
- 89 Rajala, M. W. *et al.* Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* **53**, 1671-1679 (2004).
- 90 Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87-91 (1993).
- 91 Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews. Immunology* **11**, 85-97, doi:10.1038/nri2921 (2011).
- 92 Rasmussen, A. T. The so-called hibernating gland. *J Morphol*, 147-205 (1923).
- 93 Morrison, S. F., Madden, C. J. & Tupone, D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell metabolism* **19**, 741-756, doi:10.1016/j.cmet.2014.02.007 (2014).
- 94 Townsend, K. L. & Tseng, Y. H. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **25**, 168-177, doi:10.1016/j.tem.2013.12.004 (2014).
- 95 Rothwell, N. J. & Stock, M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* **281**, 31-35 (1979).
- 96 Lee, P., Swarbrick, M. M. & Ho, K. K. Brown adipose tissue in adult humans: a metabolic renaissance. *Endocrine reviews* **34**, 413-438, doi:10.1210/er.2012-1081 (2013).
- 97 Nicholls, D. G., Bernson, V. S. & Heaton, G. M. The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia. Supplementum* **32**, 89-93 (1978).
- 98 Golozoubova, V. *et al.* Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**, 2048-2050, doi:10.1096/fj.00-0536fje (2001).
- 99 Krauss, S., Zhang, C. Y. & Lowell, B. B. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 248-261, doi:10.1038/nrm1572 (2005).
- 100 Feldmann, H. M., Golozoubova, V., Cannon, B. & Nedergaard, J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell metabolism* **9**, 203-209, doi:10.1016/j.cmet.2008.12.014 (2009).
- 101 Cannon, B. & Nedergaard, J. Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *The Journal of experimental biology* **214**, 242-253, doi:10.1242/jeb.050989 (2011).

102 Haman, F. Shivering in the cold: from mechanisms of fuel selection to survival. *J Appl Physiol*  
(1985) **100**, 1702-1708, doi:10.1152/japplphysiol.01088.2005 (2006).

103 Nguyen, K. D. *et al.* Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain  
adaptive thermogenesis. *Nature* **480**, 104-108, doi:10.1038/nature10653 (2011).

104 Collins, S. beta-Adrenoceptor Signaling Networks in Adipocytes for Recruiting Stored Fat and  
Energy Expenditure. *Frontiers in endocrinology* **2**, 102, doi:10.3389/fendo.2011.00102 (2011).

105 Thonberg, H., Lindgren, E. M., Nedergaard, J. & Cannon, B. As the proliferation promoter  
noradrenaline induces expression of ICER (induced cAMP early repressor) in proliferative brown  
adipocytes, ICER may not be a universal tumour suppressor. *The Biochemical journal* **354**, 169-  
177 (2001).

106 Thonberg, H., Fredriksson, J. M., Nedergaard, J. & Cannon, B. A novel pathway for adrenergic  
stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via  
alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation. *The Biochemical journal* **364**, 73-79 (2002).

107 Bianco, A. C. & Silva, J. E. Optimal response of key enzymes and uncoupling protein to cold in BAT  
depends on local T3 generation. *The American journal of physiology* **253**, E255-263 (1987).

108 Silva, J. E. & Larsen, P. R. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose  
tissue. *Nature* **305**, 712-713 (1983).

109 Villarroya, F. & Vidal-Puig, A. Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell*  
*metabolism* **17**, 638-643, doi:10.1016/j.cmet.2013.02.020 (2013).

110 Hondares, E. *et al.* Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk  
intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell metabolism* **11**, 206-  
212, doi:10.1016/j.cmet.2010.02.001 (2010).

111 Hondares, E. *et al.* Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown  
adipose tissue. *The Journal of biological chemistry* **286**, 12983-12990,  
doi:10.1074/jbc.M110.215889 (2011).

112 Fisher, F. M. *et al.* FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive  
thermogenesis. *Genes & development* **26**, 271-281, doi:10.1101/gad.177857.111 (2012).

113 Douris, N. *et al.* Central Fibroblast Growth Factor 21 Browns White Fat via Sympathetic Action in  
Male Mice. *Endocrinology* **156**, 2470-2481, doi:10.1210/en.2014-2001 (2015).

114 Broeders, E. P. *et al.* The Bile Acid Chenodeoxycholic Acid Increases Human Brown Adipose Tissue  
Activity. *Cell metabolism* **22**, 418-426, doi:10.1016/j.cmet.2015.07.002 (2015).

115 Fang, S. *et al.* Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and  
insulin resistance. *Nature medicine* **21**, 159-165, doi:10.1038/nm.3760 (2015).

116 Beiroa, D. *et al.* GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning  
through hypothalamic AMPK. *Diabetes* **63**, 3346-3358, doi:10.2337/db14-0302 (2014).

117 Roberts, L. D. *et al.* beta-Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic beta-  
oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. *Cell metabolism* **19**, 96-  
108, doi:10.1016/j.cmet.2013.12.003 (2014).

118 Jeremic, N., Chaturvedi, P. & Tyagi, S. C. Browning of White Fat: Novel Insight Into Factors,  
Mechanisms, and Therapeutics. *Journal of cellular physiology* **232**, 61-68, doi:10.1002/jcp.25450  
(2017).

119 Lee, P. *et al.* Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in  
humans. *Cell metabolism* **19**, 302-309, doi:10.1016/j.cmet.2013.12.017 (2014).

120 Kim, K. H. *et al.* Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by  
inducing Fgf21 as a mitokine. *Nature medicine* **19**, 83-92, doi:10.1038/nm.3014 (2013).

121 Bordicchia, M. *et al.* Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat  
thermogenic program in mouse and human adipocytes. *The Journal of clinical investigation* **122**,  
1022-1036, doi:10.1172/JCI59701 (2012).

122 Rosell, M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and -gamma, and cAMP-  
mediated pathways, control retinol-binding protein-4 gene expression in brown adipose tissue.  
*Endocrinology* **153**, 1162-1173, doi:10.1210/en.2011-1367 (2012).



- 123 Bonet, M. L. *et al.* Opposite effects of feeding a vitamin A-deficient diet and retinoic acid treatment on brown adipose tissue uncoupling protein 1 (UCP1), UCP2 and leptin expression. *The Journal of endocrinology* **166**, 511-517 (2000).
- 124 Andrade, J. M. *et al.* Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *European journal of nutrition* **53**, 1503-1510, doi:10.1007/s00394-014-0655-6 (2014).
- 125 Yoneshiro, T. *et al.* Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *The Journal of clinical investigation* **123**, 3404-3408, doi:10.1172/JCI67803 (2013).
- 126 Ohyama, K. *et al.* A Synergistic Antiobesity Effect by a Combination of Capsinoids and Cold Temperature Through Promoting Beige Adipocyte Biogenesis. *Diabetes* **65**, 1410-1423, doi:10.2337/db15-0662 (2016).
- 127 Bishnoi, M., Kondepudi, K. K., Gupta, A., Karmase, A. & Boparai, R. K. Expression of multiple Transient Receptor Potential channel genes in murine 3T3-L1 cell lines and adipose tissue. *Pharmacological reports : PR* **65**, 751-755 (2013).
- 128 Villarroya, F., Cereijo, R., Villarroya, J. & Giralt, M. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nature reviews. Endocrinology* **13**, 26-35, doi:10.1038/nrendo.2016.136 (2017).
- 129 Bartness, T. J., Vaughan, C. H. & Song, C. K. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* **34 Suppl 1**, S36-42, doi:10.1038/ijo.2010.182 (2010).
- 130 Sun, K. *et al.* Brown adipose tissue derived VEGF-A modulates cold tolerance and energy expenditure. *Molecular metabolism* **3**, 474-483, doi:10.1016/j.molmet.2014.03.010 (2014).
- 131 Mahdavian, K., Chess, D., Wu, Y., Shiriha, O. & Aprahamian, T. R. Autocrine effect of vascular endothelial growth factor-A is essential for mitochondrial function in brown adipocytes. *Metabolism: clinical and experimental* **65**, 26-35, doi:10.1016/j.metabol.2015.09.012 (2016).
- 132 Whittle, A. J. *et al.* BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* **149**, 871-885, doi:10.1016/j.cell.2012.02.066 (2012).
- 133 Burysek, L. & Houstek, J. beta-Adrenergic stimulation of interleukin-1alpha and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. *FEBS letters* **411**, 83-86 (1997).
- 134 Rao, R. R. *et al.* Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* **157**, 1279-1291, doi:10.1016/j.cell.2014.03.065 (2014).
- 135 Yang, Z. & Klionsky, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology* **22**, 124-131, doi:10.1016/j.ceb.2009.11.014 (2010).
- 136 Klionsky, D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 931-937, doi:10.1038/nrm2245 (2007).
- 137 Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* **333**, 169-174 (1993).
- 138 De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. & Appelmans, F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *The Biochemical journal* **60**, 604-617 (1955).
- 139 De Duve, C. & Wattiaux, R. Functions of lysosomes. *Annual review of physiology* **28**, 435-492, doi:10.1146/annurev.ph.28.030166.002251 (1966).
- 140 Li, W. W., Li, J. & Bao, J. K. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **69**, 1125-1136, doi:10.1007/s00018-011-0865-5 (2012).
- 141 Liu, X. M. *et al.* ESCRTs Cooperate with a Selective Autophagy Receptor to Mediate Vacuolar Targeting of Soluble Cargos. *Molecular cell* **59**, 1035-1042, doi:10.1016/j.molcel.2015.07.034 (2015).
- 142 Mukherjee, A., Patel, B., Koga, H., Cuervo, A. M. & Jenny, A. Selective endosomal microautophagy is starvation-inducible in *Drosophila*. *Autophagy*, 1-16, doi:10.1080/15548627.2016.1208887 (2016).
- 143 Bento, C. F. *et al.* Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annual review of biochemistry* **85**, 685-713, doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014556 (2016).

- 144 Mizushima, N. *et al.* Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of cell biology* **152**, 657-668 (2001).
- 145 Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I. & Mizushima, N. Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy. *Journal of cell science* **125**, 1488-1499, doi:10.1242/jcs.094110 (2012).
- 146 Mizushima, N. *et al.* A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395-398, doi:10.1038/26506 (1998).
- 147 Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *The Journal of biological chemistry* **273**, 33889-33892 (1998).
- 148 Lv, L. *et al.* Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth. *Molecular cell* **42**, 719-730, doi:10.1016/j.molcel.2011.04.025 (2011).
- 149 Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kaushik, S., Kiffin, R. & Cuervo, A. M. Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Molecular cell* **39**, 535-547, doi:10.1016/j.molcel.2010.08.004 (2010).
- 150 Cuervo, A. M. & Dice, J. F. Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic* **1**, 570-583 (2000).
- 151 Cuervo, A. M. & Wong, E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell research* **24**, 92-104, doi:10.1038/cr.2013.153 (2014).
- 152 McAlpine, F., Williamson, L. E., Tooze, S. A. & Chan, E. Y. Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy* **9**, 361-373, doi:10.4161/auto.23066 (2013).
- 153 Suzuki, H., Kaizuka, T., Mizushima, N. & Noda, N. N. Structure of the Atg101-Atg13 complex reveals essential roles of Atg101 in autophagy initiation. *Nature structural & molecular biology* **22**, 572-580, doi:10.1038/nsmb.3036 (2015).
- 154 Itakura, E. & Mizushima, N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* **6**, 764-776 (2010).
- 155 Russell, R. C. *et al.* ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature cell biology* **15**, 741-750, doi:10.1038/ncb2757 (2013).
- 156 Axe, E. L. *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* **182**, 685-701, doi:10.1083/jcb.200803137 (2008).
- 157 Hailey, D. W. *et al.* Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**, 656-667, doi:10.1016/j.cell.2010.04.009 (2010).
- 158 Hamasaki, M. *et al.* Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* **495**, 389-393, doi:10.1038/nature11910 (2013).
- 159 Yamamoto, H. *et al.* Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *The Journal of cell biology* **198**, 219-233, doi:10.1083/jcb.201202061 (2012).
- 160 Orsi, A. *et al.* Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Molecular biology of the cell* **23**, 1860-1873, doi:10.1091/mbc.E11-09-0746 (2012).
- 161 Mizushima, N. *et al.* Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of cell science* **116**, 1679-1688 (2003).
- 162 Weidberg, H. *et al.* LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO journal* **29**, 1792-1802, doi:10.1038/emboj.2010.74 (2010).
- 163 Hemelaar, J., Lelyveld, V. S., Kessler, B. M. & Ploegh, H. L. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *The Journal of biological chemistry* **278**, 51841-51850, doi:10.1074/jbc.M308762200 (2003).

- 164 Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**, 1-222, doi:10.1080/15548627.2015.1100356 (2016).
- 165 Komatsu, M. *et al.* Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *The Journal of cell biology* **169**, 425-434, doi:10.1083/jcb.200412022 (2005).
- 166 Zucchi, P. C. & Zick, M. Membrane fusion catalyzed by a Rab, SNAREs, and SNARE chaperones is accompanied by enhanced permeability to small molecules and by lysis. *Molecular biology of the cell* **22**, 4635-4646, doi:10.1091/mbc.E11-08-0680 (2011).
- 167 Wang, H. *et al.* GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 7015-7020, doi:10.1073/pnas.1507263112 (2015).
- 168 Koga, H., Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**, 3052-3065, doi:10.1096/fj.09-144519 (2010).
- 169 Kaushik, S., Massey, A. C., Mizushima, N. & Cuervo, A. M. Constitutive activation of chaperone-mediated autophagy in cells with impaired macroautophagy. *Molecular biology of the cell* **19**, 2179-2192, doi:10.1091/mbc.E07-11-1155 (2008).
- 170 Schneider, J. L. *et al.* Loss of hepatic chaperone-mediated autophagy accelerates proteostasis failure in aging. *Aging cell* **14**, 249-264, doi:10.1111/accel.12310 (2015).
- 171 Boya, P. *et al.* Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and cellular biology* **25**, 1025-1040, doi:10.1128/MCB.25.3.1025-1040.2005 (2005).
- 172 Hosokawa, N. *et al.* Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell* **20**, 1981-1991, doi:10.1091/mbc.E08-12-1248 (2009).
- 173 Nazio, F. *et al.* mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nature cell biology* **15**, 406-416, doi:10.1038/ncb2708 (2013).
- 174 Sardiello, M. *et al.* A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* **325**, 473-477, doi:10.1126/science.1174447 (2009).
- 175 Settembre, C. *et al.* TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* **332**, 1429-1433, doi:10.1126/science.1204592 (2011).
- 176 Settembre, C. *et al.* A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO journal* **31**, 1095-1108, doi:10.1038/emboj.2012.32 (2012).
- 177 Koren, I., Reem, E. & Kimchi, A. DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. *Current biology : CB* **20**, 1093-1098, doi:10.1016/j.cub.2010.04.041 (2010).
- 178 Inoki, K., Li, Y., Xu, T. & Guan, K. L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development* **17**, 1829-1834, doi:10.1101/gad.1110003 (2003).
- 179 Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K. L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* **4**, 648-657, doi:10.1038/ncb839 (2002).
- 180 Sancak, Y. *et al.* Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**, 290-303, doi:10.1016/j.cell.2010.02.024 (2010).
- 181 Egan, D. F. *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**, 456-461, doi:10.1126/science.1196371 (2011).
- 182 Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K. L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* **13**, 132-141, doi:10.1038/ncb2152 (2011).
- 183 Shang, L. *et al.* Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 4788-4793, doi:10.1073/pnas.1100844108 (2011).
- 184 Kroemer, G., Marino, G. & Levine, B. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell* **40**, 280-293, doi:10.1016/j.molcel.2010.09.023 (2010).

- 185 Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J. & Jin, S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways  
in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**,  
8204-8209, doi:10.1073/pnas.0502857102 (2005).
- 186 Tasdemir, E. *et al.* A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy* **4**, 810-814 (2008).
- 187 Tasdemir, E. *et al.* Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature cell biology* **10**, 676-687,  
doi:10.1038/ncb1730 (2008).
- 188 Hoshino, A. *et al.* Inhibition of p53 preserves Parkin-mediated mitophagy and pancreatic beta-cell  
function in diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of  
America* **111**, 3116-3121, doi:10.1073/pnas.1318951111 (2014).
- 189 Hoshino, A. *et al.* Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial  
dysfunction in the mouse heart. *Nature communications* **4**, 2308, doi:10.1038/ncomms3308  
(2013).
- 190 Song, Y. M. *et al.* Metformin Restores Parkin-Mediated Mitophagy, Suppressed by Cytosolic p53.  
*International journal of molecular sciences* **17**, doi:10.3390/ijms17010122 (2016).
- 191 Ganley, I. G., Wong, P. M., Gammoh, N. & Jiang, X. Distinct autophagosomal-lysosomal fusion  
mechanism revealed by thapsigargin-induced autophagy arrest. *Molecular cell* **42**, 731-743,  
doi:10.1016/j.molcel.2011.04.024 (2011).
- 192 Sarkar, S. *et al.* Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *The Journal  
of cell biology* **170**, 1101-1111, doi:10.1083/jcb.200504035 (2005).
- 193 Williams, A. *et al.* Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy  
pathway. *Nature chemical biology* **4**, 295-305, doi:10.1038/nchembio.79 (2008).
- 194 Holen, I., Gordon, P. B., Stromhaug, P. E. & Seglen, P. O. Role of cAMP in the regulation of  
hepatocytic autophagy. *European journal of biochemistry* **236**, 163-170 (1996).
- 195 Shahnazari, S., Namolovan, A., Mogridge, J., Kim, P. K. & Brumell, J. H. Bacterial toxins can inhibit  
host cell autophagy through cAMP generation. *Autophagy* **7**, 957-965 (2011).
- 196 Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M. & Levine, B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2  
regulates starvation-induced autophagy. *Molecular cell* **30**, 678-688,  
doi:10.1016/j.molcel.2008.06.001 (2008).
- 197 Wang, R. C. *et al.* Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1  
phosphorylation. *Science* **338**, 956-959, doi:10.1126/science.1225967 (2012).
- 198 Zhao, J. *et al.* FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and  
proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism* **6**, 472-483,  
doi:10.1016/j.cmet.2007.11.004 (2007).
- 199 Fullgrabe, J., Klionsky, D. J. & Joseph, B. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic  
control of autophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology* **15**, 65-74, doi:10.1038/nrm3716  
(2014).
- 200 Settembre, C. *et al.* TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced  
autoregulatory loop. *Nature cell biology* **15**, 647-658, doi:10.1038/ncb2718 (2013).
- 201 Liu, H. Y. *et al.* Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and  
hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin.  
*The Journal of biological chemistry* **284**, 31484-31492, doi:10.1074/jbc.M109.033936 (2009).
- 202 Seok, S. *et al.* Transcriptional regulation of autophagy by an FXR-CREB axis. *Nature* **516**, 108-111,  
doi:10.1038/nature13949 (2014).
- 203 Mammucari, C. *et al.* FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism* **6**, 458-  
471, doi:10.1016/j.cmet.2007.11.001 (2007).
- 204 Guo, L. *et al.* Transactivation of Atg4b by C/EBPbeta promotes autophagy to facilitate  
adipogenesis. *Molecular and cellular biology* **33**, 3180-3190, doi:10.1128/MCB.00193-13 (2013).
- 205 Ma, D., Panda, S. & Lin, J. D. Temporal orchestration of circadian autophagy rhythm by C/EBPbeta.  
*The EMBO journal* **30**, 4642-4651, doi:10.1038/emboj.2011.322 (2011).
- 206 Singh, R. & Cuervo, A. M. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell metabolism* **13**, 495-  
504, doi:10.1016/j.cmet.2011.04.004 (2011).



207 Kaur, J. & Debnath, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature reviews. Molecular cell biology* **16**, 461-472, doi:10.1038/nrm4024 (2015).

208 Lum, J. J. *et al.* Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **120**, 237-248, doi:10.1016/j.cell.2004.11.046 (2005).

209 Ezaki, J. *et al.* Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy* **7**, 727-736 (2011).

210 Kotoulas, O. B., Kalamidas, S. A. & Kondomerkos, D. J. Glycogen autophagy in glucose homeostasis. *Pathology, research and practice* **202**, 631-638, doi:10.1016/j.prp.2006.04.001 (2006).

211 Jung, H. S. *et al.* Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell metabolism* **8**, 318-324, doi:10.1016/j.cmet.2008.08.013 (2008).

212 Singh, R. *et al.* Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* **458**, 1131-1135, doi:10.1038/nature07976 (2009).

213 Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J. & Heintz, N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15077-15082, doi:10.1073/pnas.2436255100 (2003).

214 Choi, A. M., Ryter, S. W. & Levine, B. Autophagy in human health and disease. *The New England journal of medicine* **368**, 1845-1846, doi:10.1056/NEJMc1303158 (2013).

215 Komatsu, M. *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-884, doi:10.1038/nature04723 (2006).

216 Hara, T. *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-889, doi:10.1038/nature04724 (2006).

217 Komatsu, M. *et al.* Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 14489-14494, doi:10.1073/pnas.0701311104 (2007).

218 Frake, R. A., Ricketts, T., Menzies, F. M. & Rubinsztein, D. C. Autophagy and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation* **125**, 65-74, doi:10.1172/JCI73944 (2015).

219 Malicdan, M. C. & Nishino, I. Autophagy in lysosomal myopathies. *Brain Pathol* **22**, 82-88, doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00543.x (2012).

220 Fujiwara, M. *et al.* Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **27**, 6002-6011, doi:10.1038/onc.2008.199 (2008).

221 Lock, R. *et al.* Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Molecular biology of the cell* **22**, 165-178, doi:10.1091/mbc.E10-06-0500 (2011).

222 Rosenfeldt, M. T. *et al.* p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature* **504**, 296-300, doi:10.1038/nature12865 (2013).

223 Lock, R., Kenific, C. M., Leidal, A. M., Salas, E. & Debnath, J. Autophagy-dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion. *Cancer discovery* **4**, 466-479, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0841 (2014).

224 Peng, Y. F. *et al.* Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells. *Autophagy* **9**, 2056-2068, doi:10.4161/auto.26398 (2013).

225 Kamphorst, J. J. *et al.* Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. *Cancer research* **75**, 544-553, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2211 (2015).

226 Katheder, N. S. *et al.* Microenvironmental autophagy promotes tumour growth. *Nature*, doi:10.1038/nature20815 (2017).

227 Lim, Y. M. *et al.* Systemic autophagy insufficiency compromises adaptation to metabolic stress and facilitates progression from obesity to diabetes. *Nature communications* **5**, 4934, doi:10.1038/ncomms5934 (2014).

- 228 Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E. S. & Hotamisligil, G. S. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell metabolism* **11**, 467-478, doi:10.1016/j.cmet.2010.04.005 (2010).
- 229 Kaushik, S. *et al.* Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. *Cell metabolism* **14**, 173-183, doi:10.1016/j.cmet.2011.06.008 (2011).
- 230 Kaushik, S. *et al.* Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis. *EMBO reports* **13**, 258-265, doi:10.1038/embor.2011.260 (2012).
- 231 Meng, Q. & Cai, D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the IkkappaB kinase beta (IKKbeta)/NF-kappaB pathway. *The Journal of biological chemistry* **286**, 32324-32332, doi:10.1074/jbc.M111.254417 (2011).
- 232 Haim, Y. *et al.* Elevated autophagy gene expression in adipose tissue of obese humans: A potential non-cell-cycle-dependent function of E2F1. *Autophagy* **11**, 2074-2088, doi:10.1080/15548627.2015.1094597 (2015).
- 233 Jansen, H. J. *et al.* Autophagy activity is up-regulated in adipose tissue of obese individuals and modulates proinflammatory cytokine expression. *Endocrinology* **153**, 5866-5874, doi:10.1210/en.2012-1625 (2012).
- 234 Kosacka, J. *et al.* Autophagy in adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes. *Molecular and cellular endocrinology* **409**, 21-32, doi:10.1016/j.mce.2015.03.015 (2015).
- 235 Lopez-Vicario, C. *et al.* Inhibition of soluble epoxide hydrolase modulates inflammation and autophagy in obese adipose tissue and liver: role for omega-3 epoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 536-541, doi:10.1073/pnas.1422590112 (2015).
- 236 Nunez, C. E. *et al.* Defective regulation of adipose tissue autophagy in obesity. *Int J Obes (Lond)* **37**, 1473-1480, doi:10.1038/ijo.2013.27 (2013).
- 237 Kovsan, J. *et al.* Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **96**, E268-277, doi:10.1210/jc.2010-1681 (2011).
- 238 Soussi, H. *et al.* DAPK2 Downregulation Associates With Attenuated Adipocyte Autophagic Clearance in Human Obesity. *Diabetes* **64**, 3452-3463, doi:10.2337/db14-1933 (2015).
- 239 Baerga, R., Zhang, Y., Chen, P. H., Goldman, S. & Jin, S. Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* **5**, 1118-1130 (2009).
- 240 Singh, R. *et al.* Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, 3329-3339, doi:10.1172/JCI39228 (2009).
- 241 Zhang, Y. *et al.* Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 19860-19865, doi:10.1073/pnas.0906048106 (2009).
- 242 Goldman, S. J., Zhang, Y. & Jin, S. Autophagic degradation of mitochondria in white adipose tissue differentiation. *Antioxidants & redox signaling* **14**, 1971-1978, doi:10.1089/ars.2010.3777 (2011).
- 243 Wilson-Fritch, L. *et al.* Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Molecular and cellular biology* **23**, 1085-1094 (2003).
- 244 Desautels, M. & Heal, S. Differentiation-dependent inhibition of proteolysis by norepinephrine in brown adipocytes. *The American journal of physiology* **277**, E215-222 (1999).
- 245 Moazed, B. & Desautels, M. Differentiation-dependent expression of cathepsin D and importance of lysosomal proteolysis in the degradation of UCP1 in brown adipocytes. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **80**, 515-525 (2002).
- 246 Moazed, B. & Desautels, M. Control of proteolysis by norepinephrine and insulin in brown adipocytes: role of ATP, phosphatidylinositol 3-kinase, and p70 S6K. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **80**, 541-552 (2002).
- 247 Reggiori, F., Komatsu, M., Finley, K. & Simonsen, A. Autophagy: more than a nonselective pathway. *International journal of cell biology* **2012**, 219625, doi:10.1155/2012/219625 (2012).
- 248 Feng, Y., He, D., Yao, Z. & Klionsky, D. J. The machinery of macroautophagy. *Cell research* **24**, 24-41, doi:10.1038/cr.2013.168 (2014).

- 249 Pickrell, A. M. & Youle, R. J. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron* **85**, 257-273, doi:10.1016/j.neuron.2014.12.007 (2015).
- 250 Bernardini, J. P., Lazarou, M. & Dewson, G. Parkin and mitophagy in cancer. *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2016.302 (2016).
- 251 Frank, M. *et al.* Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochimica et biophysica acta* **1823**, 2297-2310, doi:10.1016/j.bbamcr.2012.08.007 (2012).
- 252 Ni, H. M., Williams, J. A. & Ding, W. X. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox biology* **4**, 6-13, doi:10.1016/j.redox.2014.11.006 (2015).
- 253 Twig, G. *et al.* Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal* **27**, 433-446, doi:10.1038/sj.emboj.7601963 (2008).
- 254 Liesa, M., Palacin, M. & Zorzano, A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological reviews* **89**, 799-845, doi:10.1152/physrev.00030.2008 (2009).
- 255 Liesa, M. & Shirihai, O. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell metabolism* **17**, 491-506, doi:10.1016/j.cmet.2013.03.002 (2013).
- 256 Wikstrom, J. D. *et al.* Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *The EMBO journal* **33**, 418-436, doi:10.1002/embj.201385014 (2014).
- 257 Poole, A. C., Thomas, R. E., Yu, S., Vincow, E. S. & Pallanck, L. The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PloS one* **5**, e10054, doi:10.1371/journal.pone.0010054 (2010).
- 258 Liu, S. *et al.* Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS genetics* **8**, e1002537, doi:10.1371/journal.pgen.1002537 (2012).
- 259 Gegg, M. E. *et al.* Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Human molecular genetics* **19**, 4861-4870, doi:10.1093/hmg/ddq419 (2010).
- 260 Matsuda, N. *et al.* PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *The Journal of cell biology* **189**, 211-221, doi:10.1083/jcb.200910140 (2010).
- 261 Narendra, D. P. *et al.* PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS biology* **8**, e1000298, doi:10.1371/journal.pbio.1000298 (2010).
- 262 Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F. & Youle, R. J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology* **183**, 795-803, doi:10.1083/jcb.200809125 (2008).
- 263 Sarraf, S. A. *et al.* Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* **496**, 372-376, doi:10.1038/nature12043 (2013).
- 264 Nguyen, T. N., Padman, B. S. & Lazarou, M. Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. *Trends in cell biology* **26**, 733-744, doi:10.1016/j.tcb.2016.05.008 (2016).
- 265 Clark, I. E. *et al.* Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* **441**, 1162-1166, doi:10.1038/nature04779 (2006).
- 266 Park, J. *et al.* Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* **441**, 1157-1161, doi:10.1038/nature04788 (2006).
- 267 Geisler, S. *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology* **12**, 119-131, doi:10.1038/ncb2012 (2010).
- 268 Nixon, R. A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature medicine* **19**, 983-997, doi:10.1038/nm.3232 (2013).
- 269 Bingol, B. & Sheng, M. Mechanisms of mitophagy: PINK1, Parkin, USP30 and beyond. *Free radical biology & medicine* **100**, 210-222, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.015 (2016).
- 270 Wang, Y. *et al.* Deubiquitinating enzymes regulate PARK2-mediated mitophagy. *Autophagy* **11**, 595-606, doi:10.1080/15548627.2015.1034408 (2015).



- 271 McLelland, G. L., Soubannier, V., Chen, C. X., McBride, H. M. & Fon, E. A. Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *The EMBO journal* **33**, 282-295, doi:10.1002/embj.201385902 (2014).
- 272 Sugiura, A., McLelland, G. L., Fon, E. A. & McBride, H. M. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *The EMBO journal* **33**, 2142-2156, doi:10.15252/embj.201488104 (2014).
- 273 Vincow, E. S. *et al.* The PINK1-Parkin pathway promotes both mitophagy and selective respiratory chain turnover in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 6400-6405, doi:10.1073/pnas.1221132110 (2013).
- 274 Scarffe, L. A., Stevens, D. A., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends in neurosciences* **37**, 315-324, doi:10.1016/j.tins.2014.03.004 (2014).
- 275 Shin, J. H. *et al.* PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell* **144**, 689-702, doi:10.1016/j.cell.2011.02.010 (2011).
- 276 Kuroda, Y. *et al.* Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Human molecular genetics* **15**, 883-895, doi:10.1093/hmg/ddl006 (2006).
- 277 Palacino, J. J. *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* **279**, 18614-18622, doi:10.1074/jbc.M401135200 (2004).
- 278 Zhang, C. *et al.* Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 16259-16264, doi:10.1073/pnas.1113884108 (2011).
- 279 Liu, K. *et al.* Parkin Regulates the Activity of Pyruvate Kinase M2. *The Journal of biological chemistry* **291**, 10307-10317, doi:10.1074/jbc.M115.703066 (2016).
- 280 Jin, H. S. *et al.* The PARK2 gene is involved in the maintenance of pancreatic beta-cell functions related to insulin production and secretion. *Molecular and cellular endocrinology* **382**, 178-189, doi:10.1016/j.mce.2013.09.031 (2014).
- 281 Kim, K. Y. *et al.* Parkin is a lipid-responsive regulator of fat uptake in mice and mutant human cells. *The Journal of clinical investigation* **121**, 3701-3712, doi:10.1172/JCI44736 (2011).
- 282 Costa, D. K. *et al.* Reduced intestinal lipid absorption and body weight-independent improvements in insulin sensitivity in high-fat diet-fed Park2 knockout mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **311**, E105-116, doi:10.1152/ajpendo.00042.2016 (2016).
- 283 Lee, J. M. *et al.* Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy. *Nature* **516**, 112-115, doi:10.1038/nature13961 (2014).
- 284 Cherra, S. J., 3rd *et al.* Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *The Journal of cell biology* **190**, 533-539, doi:10.1083/jcb.201002108 (2010).
- 285 Singh, R. & Cuervo, A. M. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *International journal of cell biology* **2012**, 282041, doi:10.1155/2012/282041 (2012).
- 286 Wang, D. Q., Portincasa, P. & Neuschwander-Tetri, B. A. Steatosis in the liver. *Comprehensive Physiology* **3**, 1493-1532, doi:10.1002/cphy.c130001 (2013).
- 287 Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nature cell biology* **17**, 759-770, doi:10.1038/ncb3166 (2015).
- 288 Nedergaard, J., Alexson, S. & Cannon, B. Cold adaptation in the rat: increased brown fat peroxisomal beta-oxidation relative to maximal mitochondrial oxidative capacity. *The American journal of physiology* **239**, C208-216 (1980).
- 289 Martinez-Lopez, N. *et al.* Autophagy in Myf5+ progenitors regulates energy and glucose homeostasis through control of brown fat and skeletal muscle development. *EMBO reports* **14**, 795-803, doi:10.1038/embor.2013.111 (2013).
- 290 Martinez-Lopez, N. *et al.* Autophagy in the CNS and Periphery Coordinate Lipophagy and Lipolysis in the Brown Adipose Tissue and Liver. *Cell metabolism* **23**, 113-127, doi:10.1016/j.cmet.2015.10.008 (2016).

- 291 Gospodarska, E., Nowialis, P. & Kozak, L. P. Mitochondrial turnover: a phenotype distinguishing  
brown adipocytes from interscapular brown adipose tissue and white adipose tissue. *The Journal  
of biological chemistry* **290**, 8243-8255, doi:10.1074/jbc.M115.637785 (2015).
- 292 Ashrafi, G. & Schwarz, T. L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of  
mitochondria. *Cell death and differentiation* **20**, 31-42, doi:10.1038/cdd.2012.81 (2013).
- 293 Dorn, G. W., 2nd. Central Parkin: The evolving role of Parkin in the heart. *Biochimica et biophysica  
acta* **1857**, 1307-1312, doi:10.1016/j.bbabbio.2016.03.014 (2016).
- 294 Bengtsson, T., Redegren, K., Strosberg, A. D., Nedergaard, J. & Cannon, B. Down-regulation of  
beta3 adrenoreceptor gene expression in brown fat cells is transient and recovery is dependent  
upon a short-lived protein factor. *The Journal of biological chemistry* **271**, 33366-33375 (1996).
- 295 Lindgren, E. M. *et al.* Noradrenaline represses PPAR (peroxisome-proliferator-activated receptor)  
gamma2 gene expression in brown adipocytes: intracellular signalling and effects on  
PPARgamma2 and PPARgamma1 protein levels. *The Biochemical journal* **382**, 597-606,  
doi:10.1042/BJ20031622 (2004).
- 296 Mauro-Lizcano, M. *et al.* New method to assess mitophagy flux by flow cytometry. *Autophagy* **11**,  
833-843, doi:10.1080/15548627.2015.1034403 (2015).
- 297 Villena, J. A. *Bases moleculars de la biogènesi mitocondrial: anàlisi del promotor del gen humà de  
la subunitat β-F1-ATP sintetasa* Biology thesis, Univeritat de Barcelona, (1998).
- 298 Quesada-Lopez, T. *et al.* The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21  
release from adipocytes. *Nature communications* **7**, 13479, doi:10.1038/ncomms13479 (2016).
- 299 Goldberg, M. S. *et al.* Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of  
dopaminergic neurons. *The Journal of biological chemistry* **278**, 43628-43635,  
doi:10.1074/jbc.M308947200 (2003).
- 300 Bartelt, A. *et al.* Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature medicine* **17**,  
200-205, doi:10.1038/nm.2297 (2011).
- 301 Altshuler-Keylin, S. *et al.* Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced  
Mitochondrial Clearance. *Cell metabolism* **24**, 402-419, doi:10.1016/j.cmet.2016.08.002 (2016).
- 302 Taylor, D. & Gottlieb, R. A. Parkin-mediated mitophagy is downregulated in browning of white  
adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* **25**, 704-712, doi:10.1002/oby.21786 (2017).
- 303 Muller, T. D. *et al.* p62 links beta-adrenergic input to mitochondrial function and thermogenesis.  
*The Journal of clinical investigation* **123**, 469-478, doi:10.1172/JCI64209 (2013).
- 304 Moreno-Navarrete, J. M. *et al.* Lipopolysaccharide binding protein is an adipokine involved in the  
resilience of the mouse adipocyte to inflammation. *Diabetologia* **58**, 2424-2434,  
doi:10.1007/s00125-015-3692-7 (2015).
- 305 Moreno-Navarrete, J. M. *et al.* A role for adipocyte-derived lipopolysaccharide-binding protein in  
inflammation- and obesity-associated adipose tissue dysfunction. *Diabetologia* **56**, 2524-2537,  
doi:10.1007/s00125-013-3015-9 (2013).
- 306 Wernstedt Asterholm, I. *et al.* Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue  
expansion and remodeling. *Cell metabolism* **20**, 103-118, doi:10.1016/j.cmet.2014.05.005 (2014).



## **APÈNDIX**

---



## **The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes**

**Revista:** Nature Communications

**PMID:** 27853148

**Títol:** El sensor de lípids GPR120 promou l'activació del greix marró i l'alliberament de FGF21 en adipòcits

### **Resum:**

L'activitat termogènica del teixit adipós marró (TAM) i el browning del teixit adipós blanc son components importants per a la despesa energètica. En aquest treball mostrem com GPR120, un receptor d'àcids grassos poliinsaturats, promou l'activació del greix marró. Utilitzant RNA-seq per tal d'analitzar el transcriptoma del TAM en ratolins, vam trobar que el gen que codifica per GPR120 es troba induït durant l'activació termogènica. A més a més mostrem com l'activació de GPR120 indueix l'activitat del TAM i promou el browning del greix blanc en ratolins, mentre que els ratolins deficients per GPR120 tenen disminuït el browning que té lloc en resposta al fred. Els àcids grassos poliinsaturats omega-3 promouen tant la diferenciació dels adipòcits marrons i beix, com l'activació termogènica; per dur a terme aquestes accions requereixen GPR120. L'activació de GPR120 indueix l'alliberament del factor de creixement fibroblàstic-21 (FGF21) per part dels adipòcits marrons i beix, i incrementa els nivells sanguinis de FGF21. Els efectes de l'activació de GPR120 sobre l'activació del TAM i el browning es troben reduïts en ratolins i cèl·lules deficients en FGF21. Així doncs, el sensor de lípids GPR120 activa el greix marró a través de mecanismes que impliquen la inducció de FGF21.





## ARTICLE

Received 15 Feb 2016 | Accepted 7 Oct 2016 | Published 17 Nov 2016

DOI: 10.1038/ncomms13479

OPEN

# The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes

Tania Quesada-López<sup>1</sup>, Rubén Cereijo<sup>1</sup>, Jean-Valéry Turatsinze<sup>2</sup>, Anna Planavila<sup>1</sup>, Montserrat Cairó<sup>1</sup>, Aleix Gavalda-Navarro<sup>1</sup>, Marion Peyrou<sup>1</sup>, Ricardo Moure<sup>1</sup>, Roser Iglesias<sup>1</sup>, Marta Giralt<sup>1</sup>, Decio L. Eizirik<sup>2</sup> & Francesc Villarroya<sup>1</sup>

The thermogenic activity of brown adipose tissue (BAT) and browning of white adipose tissue are important components of energy expenditure. Here we show that GPR120, a receptor for polyunsaturated fatty acids, promotes brown fat activation. Using RNA-seq to analyse mouse BAT transcriptome, we find that the gene encoding GPR120 is induced by thermogenic activation. We further show that GPR120 activation induces BAT activity and promotes the browning of white fat in mice, whereas GPR120-null mice show impaired cold-induced browning. Omega-3 polyunsaturated fatty acids induce brown and beige adipocyte differentiation and thermogenic activation, and these effects require GPR120. GPR120 activation induces the release of fibroblast growth factor-21 (FGF21) by brown and beige adipocytes, and increases blood FGF21 levels. The effects of GPR120 activation on BAT activation and browning are impaired in FGF21-null mice and cells. Thus, the lipid sensor GPR120 activates brown fat via a mechanism that involves induction of FGF21.

<sup>1</sup>Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular, Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona (IBUB) and CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutrición, Avda Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. <sup>2</sup>ULB Center for Diabetes Research, Medical Faculty, Université Libre de Bruxelles, Avenue Franklin Roosevelt 50, 1050 Brussels, Belgium. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.V. (email: fvillarroya@ub.edu).

**B**rown adipose tissue (BAT) is the main site of non-shivering thermogenesis in mammals. It confers a unique mechanism for energy expenditure and heat production in response to cold and provides a protective mechanism against excessive body weight accumulation in response to overfeeding<sup>1,2</sup>. The interest in brown fat activity as a mechanism of protection against the obesity and metabolic diseases has been renewed by the recent recognition that adult humans possess active BAT, and its activity is negatively associated with obesity and type II diabetes<sup>3</sup>. Many aspects of the molecular mechanisms underlying the function of BAT are known, but we do not comprehensively understand how BAT activity is controlled and integrated with whole organism metabolism to ensure that metabolic substrates are burned and heat is provided. Recent studies unravelled an additional BAT-related means to control energy expenditure, wherein white adipose tissue (WAT) has the capacity to acquire BAT-like properties via the so-called 'browning' process. During this process, sustained thermogenic activation leads to the appearance of the so-called beige or brite adipocytes in WAT depots, which, like classical brown adipocytes, express uncoupling protein-1 (UCP1) and perform uncoupled mitochondrial respiration<sup>4,5</sup>. Several lines of evidence suggest that the browning process is especially relevant in controlling whole-body energy balance<sup>4</sup>. This may reflect its high inducibility in response to environmental factors and the ability of beige cells to use additional, non-UCP1-mediated energy expending mechanisms<sup>6</sup>.

Studies aimed at assessing how BAT responds to cold can improve our understanding of the processes that mediate BAT activation. Transcriptomic profiling of BAT from cold-exposed mice can provide a snapshot of how BAT responds to the thermogenic activation and may offer an unbiased look at novel BAT activity-related actors. Recently, RNA sequencing (RNA-seq) has emerged as the best tool for transcriptomic studies, as it does not require *a priori* knowledge of targets, and shows both high reproducibility and a low frequency of false positives<sup>7–9</sup>. Moreover, RNA-seq can identify 25–75% more genes than complementary DNA (cDNA) microarrays, and it allows assessment of both whole genes and splice variants<sup>10,11</sup>.

Here we used RNA-seq to analyse the responsiveness of BAT to the cold-induced thermogenic activation. Departing from these data set, we identified a novel pathway through which thermogenic activation of BAT and the browning of WAT occur via the activation of GPR120 (*FFAR4*). GPR120 is a G-protein-coupled receptor that binds unsaturated long-chain fatty acids and their derivatives<sup>12</sup>. GPR120 is known to contribute to mediating the anti-inflammatory actions of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and in protecting against obesity and type II diabetes<sup>13,14</sup>. Here we identify a novel pathway of thermogenic regulation through that PUFA-mediated GPR120 activation induces BAT activity and WAT browning via the hormonal factor fibroblast growth factor-21 (FGF21).

## Results

**Effect of cold exposure on BAT transcriptome.** RNA-seq data were obtained from BAT samples obtained from mice housed under thermoneutral conditions or following a 24-h exposure to 4 °C. Among the 21,391 genes detected by the RNA-seq as being 'expressed' (RPKM > 0) a total of 3,470 (16.2%) were significantly modified under the cold condition: 2,498 and 972 were upregulated and downregulated, respectively. To validate our analysis and identify novel candidate genes related to the thermogenic activation in BAT, the top 10% most cold-induced genes were arbitrarily selected for manually curated analysis. Most were already known to be upregulated by cold; these

included key components of mitochondrial uncoupling (*UCP1*, 4.5-fold induction), lipid metabolism (*Elovl3*, 9.9-fold induction; and *glycerokinase*, 5.4-fold induction), intracellular regulation (*Dio2*, 4.8-fold induction; and *PGC-1 $\alpha$* , 3.3-fold induction) and extracellular regulation (*Bmp8b* and *FGF21*, > 10-fold inductions). Among the top-induced genes that had not been previously studied, we focused on *FFAR4* (GPR120). This G-protein-coupled receptor binds unsaturated long-chain fatty acids and their derivatives, and has been proposed to mediate multiple metabolic effects, including anti-inflammation and amelioration of insulin resistance<sup>12,13</sup>. Allelic variants causing loss-of-function put human individuals at risk to develop obesity<sup>14</sup>. A comparison of our RNA-seq data with two microarray-based data sets<sup>7,8</sup> and a digital gene expression profiling<sup>15</sup> revealed that GPR120 was consistently and strongly upregulated in BAT following cold exposure. Here we set out to assess the regulation and function of GPR120 in relation to BAT activation.

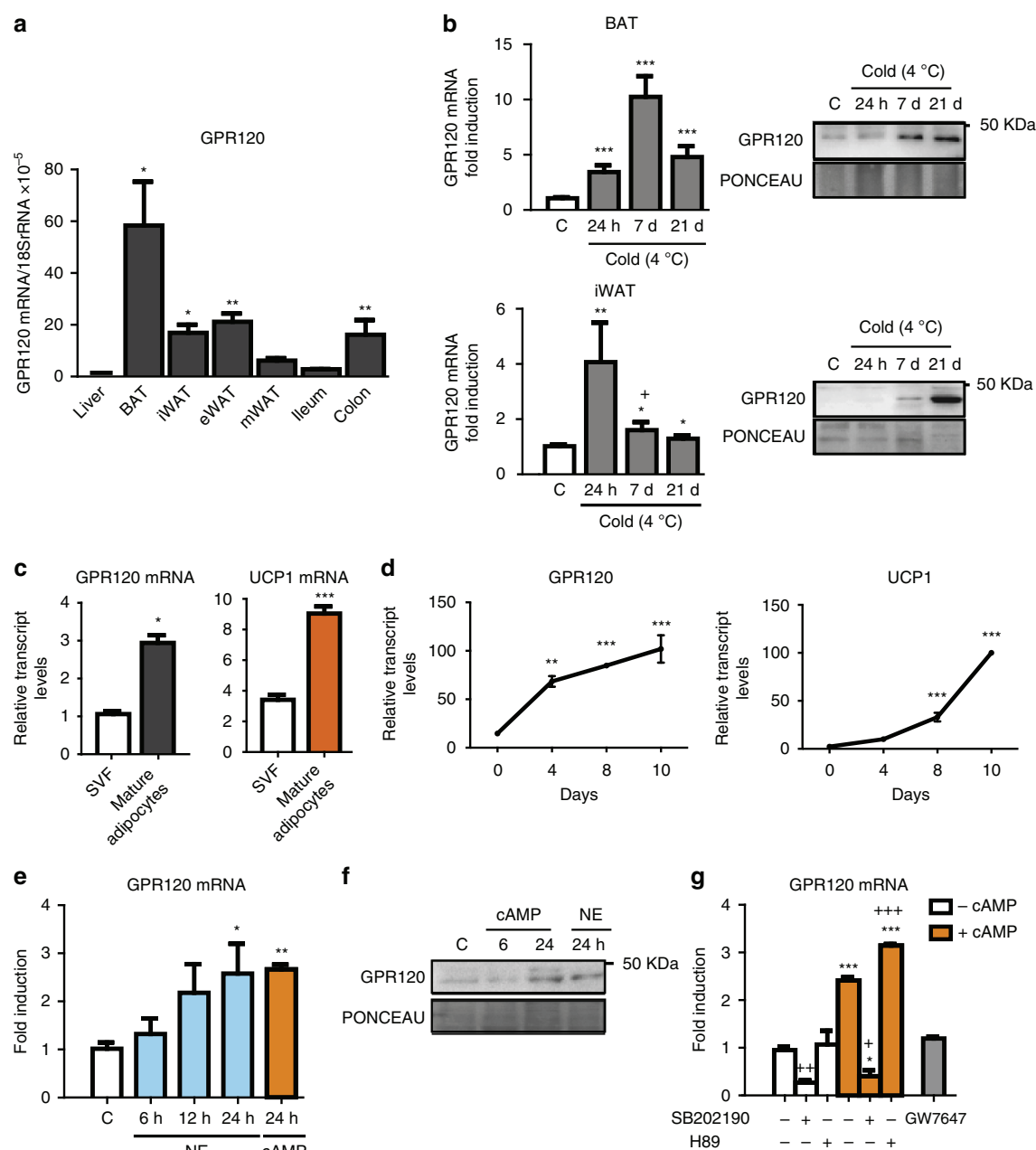
**Thermogenic activation upregulates GPR120 in fat depots.** The expression of *GPR120* transcript was determined in adipose depots from mice reared at 21 °C in comparison with small intestine and colon that express functional levels of *GPR120* (refs 16,17). The highest expression was found in interscapular BAT (iBAT), while specific WAT depots (inguinal, iWAT; epididymal, eWAT; and mesenteric WAT) showed lower but still relevant expression (Fig. 1a; Supplementary Fig. 1). The expression of *GPR120* messenger RNA (mRNA) was strongly induced in BAT of mice subjected to either short- or long-term cold exposure (Fig. 1b). Cold also induced *GPR120* mRNA expression in iWAT. GPR120 protein levels were increased in both BAT and iWAT after cold exposure (Fig. 1b).

Similar to markers of brown adipocyte thermogenic activity (for example, *UCP1*), *GPR120* was preferentially expressed in mature, differentiated, brown adipocytes rather than in the stromal vascular fraction (Fig. 1c).

In cultured precursor cells from iBAT, *GPR120* expression was low at the pre-adipocyte stage, increased progressively during brown adipocyte differentiation and peaked at full differentiation (day 10, maximal expression of *UCP1*; (Fig. 1d). Norepinephrine or cyclic AMP (cAMP), the major mediators of thermogenic induction, significantly upregulated GPR120 transcript (Fig. 1e) and protein levels (Fig. 1f) in brown adipocytes. The effects of norepinephrine (NE) and cAMP were blunted by the p38 MAPK inhibitor SB202190, but not by the protein kinase-A (PKA) inhibitor H89 (Fig. 1g). This contrasts with *UCP1* mRNA whose induction by NE and cAMP was partially blunted both by SB202190 and H89, in accordance with the dual involvement of p38 MAPK and PKA in the control of *UCP1* gene expression<sup>18</sup> (Supplementary Fig. 1). GW7647, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) activator, did not significantly alter *GPR120* expression (Fig. 1g).

In summary, we herein identified GPR120 as a novel component of the acquisition of the differentiated phenotype of brown adipocytes and showed that it is induced *in vivo* and *in vitro* in BAT by noradrenergic regulators of thermogenic activation.

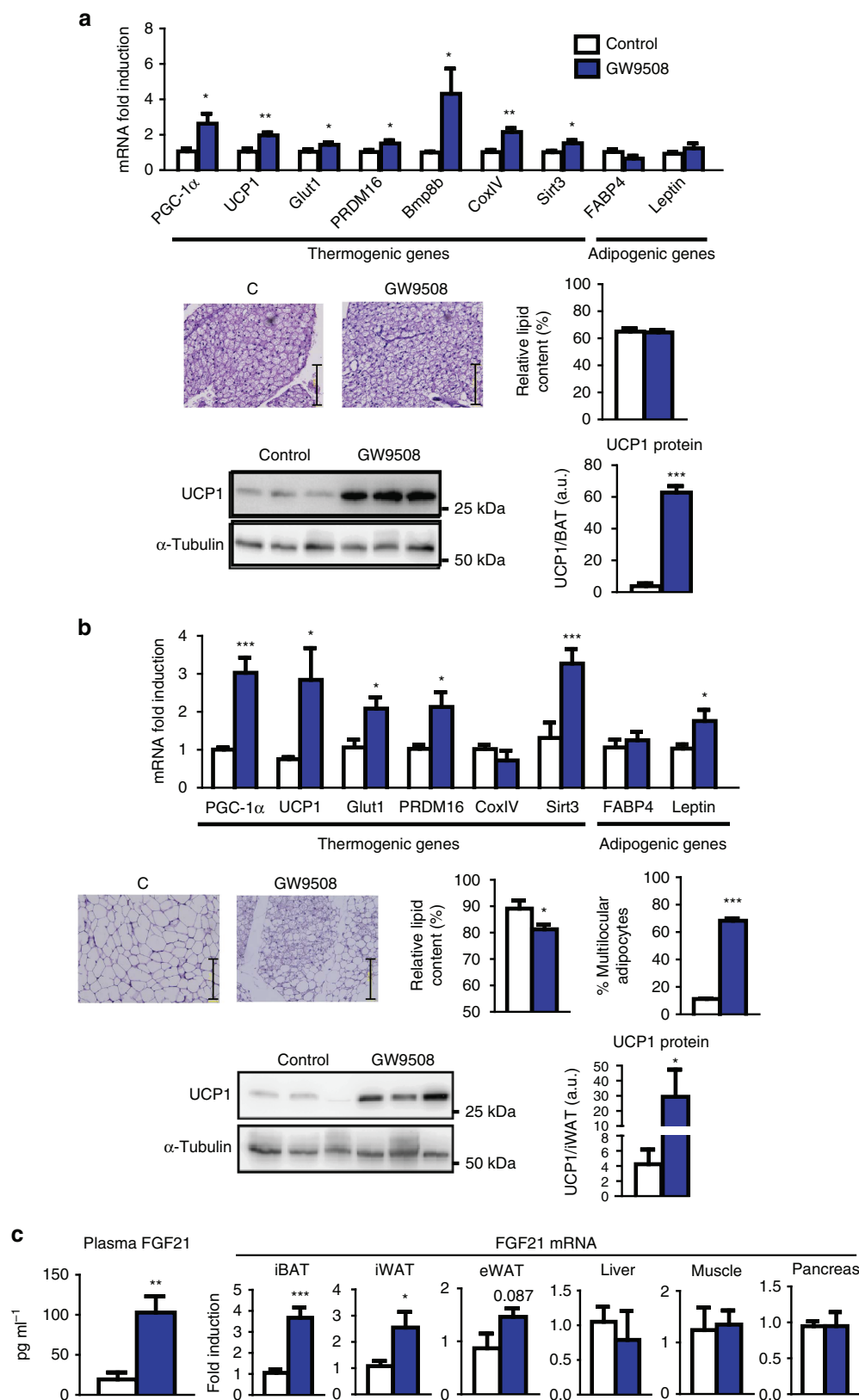
**GW9508 increases the thermogenic activity of BAT and WAT.** Mice were treated with GW9508, an activator of GPR120, via their food during 7 days. This treatment did not significantly modify body weight or food intake. Metabolic profiling revealed unaltered glycaemia and triglyceridemia, but GW9508 induced a reduction in insulin levels (Supplementary Table 1), which could reflect improvement in insulin sensitivity. The other tested hormone levels were unaltered following GW9508 treatment



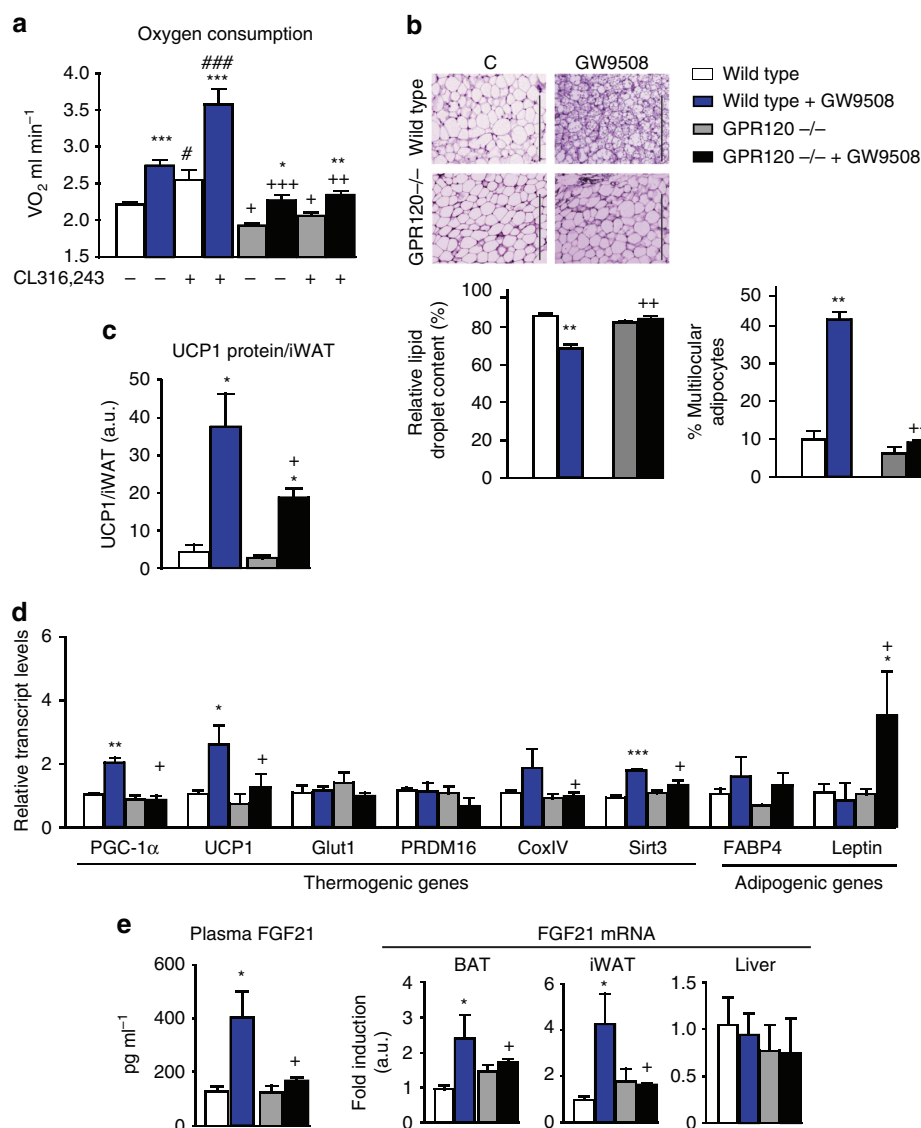
**Figure 1 | Regulation of GPR120 gene expression in BAT and brown adipocytes.** For **a**, **b**, tissues from adult mice were analysed. **(a)** Relative expression of *GPR120* mRNA in liver, BAT, iWAT, eWAT, mWAT, ileum and colon ( $n = 4$ ) was quantified. **(b)** *GPR120* mRNA expression in BAT and iWAT from adult mice maintained at thermoneutrality (29 °C) or exposed to cold (4 °C) for 24 h, 7 days and 21 days ( $n = 5$ ) in the left, representative immunoblot of three independent assays of the relative changes of *GPR120* protein, in the right. **(c)** mRNA levels of *GPR120* and *UCP1* in the stromal vascular fraction (SVF) and mature adipocytes obtained from iBAT ( $n = 3$ ). For **d**–**g**, BAT precursor cells were differentiated. **(d)** mRNA expression patterns for *GPR120* and *UCP1* during brown adipocyte differentiation in primary cultures, as assessed at days 0 (pre-adipocytes) 4, 8, and 10 ( $n = 3$ ). **(e)** *GPR120* mRNA levels in differentiated brown adipocytes treated with 0.5  $\mu$ M norepinephrine (NE) for 6, 12 and 24 h (blue bars) or with 1 mM dibutyryl-cAMP for 24 h (orange bars;  $n = 4$ ). **(f)** Representative immunoblot of three independent assays of the relative changes of *GPR120* protein levels in response to the indicated NE and cAMP treatments. **(g)** Effects of 10  $\mu$ M SB202190 (a p38 MAPK inhibitor), or 20  $\mu$ M H89 (a PKA inhibitor) on the upregulation of *GPR120* mRNA in response to 1 mM dibutyryl-cAMP (orange bars), and effects of 1  $\mu$ M GW7647 (PPAR $\alpha$  agonist, grey bar;  $n = 4$ ). Bars are means  $\pm$  s.e.m. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared with corresponding controls, or ileum; +  $P < 0.05$ , ++  $P < 0.01$ , +++  $P < 0.001$  for the effects of SB202190 or H89; for **a**, **b**, **e** and **g** analysis of variance with Tukey's *post hoc* test was used; for **c** and **d** two-tailed unpaired Student's *t*-test was performed).

(Supplementary Table 1) with the exception of FGF21 levels, which were markedly induced (see below). The 1-week exposure to GW9508 treatment did not significantly modify the gross masses of iBAT, iWAT, eWAT or mesenteric WAT (Supplementary Table 1). Gene expression analysis revealed significant upregulations among markers of thermogenic activation

in BAT, such as *UCP1*, *PGC-1 $\alpha$* , *CoxIV* and *Sirt3*, as well as *Glut1*, but no change in overall adipogenesis. (Fig. 2a). *UCP1* protein levels in the iBAT depot were also significantly increased (Fig. 2a). Microscopy examination of iBAT did not reveal major changes (Fig. 2a). In iWAT, we observed strong evidence of GW9508-induced browning, including upregulation of markers of brown-



**Figure 2 | GW9508 upregulates thermogenic genes in iBAT and browning in iWAT while inducing FGF21 expression and release.** Adult mice were fed for 7 days a control diet (white bars) or a diet supplemented with GW9508 (blue bars;  $n = 6$ ). **(a)** Relative expression levels of thermogenic and adipogenic genes in iBAT, representative optical microscopy images from H&E-stained iBAT (scale bar, 125  $\mu$ m), relative lipid content, UCP1 protein levels and representative UCP1 immunoblot. **(b)** Relative expression levels of thermogenic and adipogenic genes in iWAT, representative optical microscopy from H&E-stained iWAT (scale bar, 125  $\mu$ m), relative lipid content, percentage of multilocular adipocytes, UCP1 protein levels and representative UCP1 immunoblot. **(c)** Circulating levels of FGF21 protein and *FGF21* mRNA expression levels in iBAT, iWAT, eWAT, liver, skeletal muscle and pancreas. Bars are means  $\pm$  s.e.m. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  relative to untreated control mice; two-tailed unpaired Student's  $t$ -test).



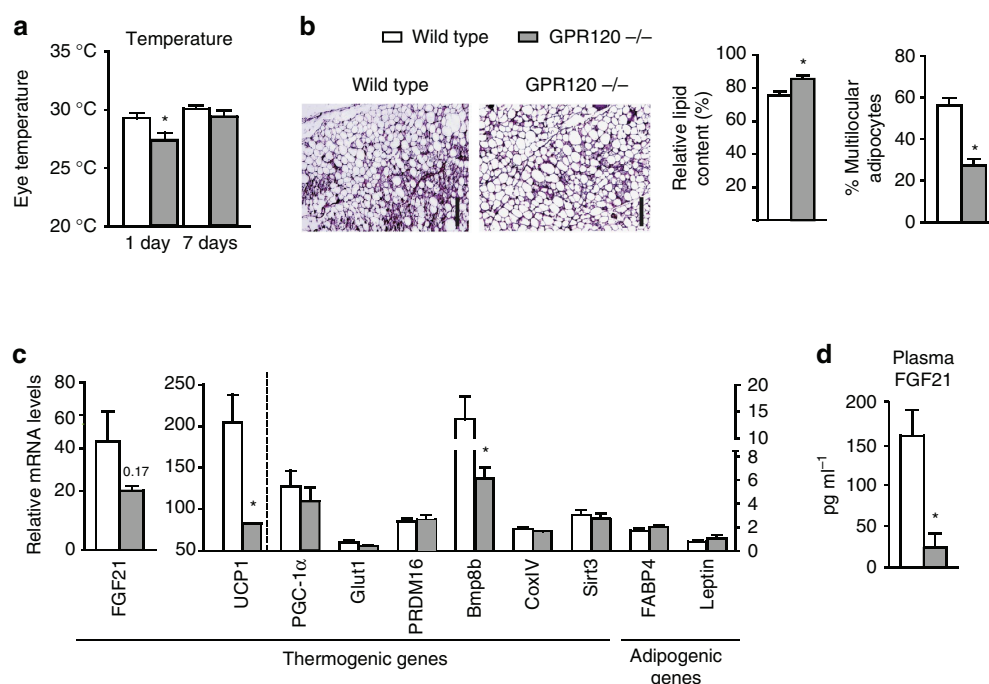
**Figure 3 | GPR120 gene invalidation blunts the effects of GW9508 on adipose tissues and systemic FGF21 levels.** Wild-type and *GPR120*<sup>-/-</sup> mice were fed a control diet (white and grey bars, respectively) or a diet supplemented with GW9508 (blue and black bars, respectively) for 7 days ( $n=5$  per group). **(a)** Oxygen consumption in basal conditions and after CL316,243 injection. **(b)** Representative optical microscopy from H&E-stained iWAT (scale bar, 200  $\mu$ m), relative lipid content and percentage of multilocular adipocytes. **(c)** UCP1 protein levels in iWAT. **(d)** Relative expression levels of thermogenic and adipogenic genes in iWAT. **(e)** Circulating levels of FGF21 protein and *FGF21* mRNA expression levels in iBAT, iWAT and liver. Bars are means  $\pm$  s.e.m. (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  and \*\*\* $P<0.001$  relative to untreated control mice of each genotype; + $P<0.05$ , ++ $P<0.01$  and +++ $P<0.001$  for the comparisons between genotypes under same GW9508 treatment status; # $P<0.05$ , ### $P<0.001$  for the effects of GW9508 treatment; analysis of variance with Tukey's *post hoc* test).

related thermogenesis (*UCP1*, *PGC-1 $\alpha$*  and *Sirt3*), and the beige adipogenesis-related gene *PRDM16* (Fig. 2b). Consistent with these data, GW9508-treated mice exhibited multiple multilocular adipocytes in iWAT, which are typically associated with the browning process (Fig. 2b). UCP1 protein levels in iWAT were significantly induced by GW9508 (Fig. 2b). Epididymal WAT showed some signs of browning, such as upregulation of *UCP1*, *PGC-1 $\alpha$*  and *Sirt3*, but no multilocular beige adipocytes (Supplementary Fig. 2).

As FGF21 is induced in association with the thermogenic activation of BAT and browning of WAT<sup>19,20</sup>, we examined FGF21 in treated mice. We found that circulating levels of FGF21 were strongly increased in GW9508-treated mice, as were the *FGF21* mRNA expression levels in BAT and iWAT (Fig. 2c), but not in other tissues such as liver, skeletal muscle or pancreas. The

lack of effects of GW9508 treatment on hepatic *FGF21* gene expression suggested that the upregulation of circulatory FGF21, following GW9508 treatment was not due to a hepatic effect. In addition to activating GPR120, GW9508 can activate another G-protein-coupled receptor, GPR40, which is expressed in the intestine<sup>21</sup> but absent in adipose tissues and minimally expressed in hepatic cells<sup>17,22</sup>. Accordingly, GPR40 transcript expression was undetectable in BAT and most WAT depots (Supplementary Fig. 3a). Moreover, the intestine does not express FGF21 under basal conditions<sup>23</sup> or following GW9508 treatment (Supplementary Fig. 3b). The glucagon gene (encoding glucagon-like peptide (GLP)-1), a target of GPR120 in the intestine<sup>21</sup>, was not altered by GW9508 treatment (Supplementary Fig. 3b). These results indicate that GW9508 treatment has only minor intestinal effects under this experimental setting.





**Figure 4 | GPR120 gene invalidation compromises thermoregulation and iWAT browning in association with a reduction in FGF21 levels.**

Wild-type (Wt, white bars) mice and *GPR120*<sup>-/-</sup> mice (grey bars) mice were exposed to cold (4 °C) for 7 days (*n* = 5). **(a)** Body temperature on days 1 and 7 of cold exposure. **(b)** Representative images of H&E-stained iWAT (scale bar, 200 μm), the relative lipid droplet content, and the percentage of multilocular adipocytes. **(c)** Relative expression levels of thermogenic and adipogenic genes in iWAT. **(d)** Circulating levels of FGF21. Bars are means + s.e.m. (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.001 relative to wild-type animals exposed to cold; two-tailed unpaired Student's *t*-test).

**Impaired action of GW9508 in *GPR120*-null mice.** To directly assess the role of GPR120 for the effects of GW9508, we analysed *GPR120*-null mice. Under basal conditions, *GPR120*-null mice did not show any significant change in body weight or in the main metabolic parameters evaluated (for example, glycaemia or triglyceridemia; Supplementary Table 2). This agrees with previous reports<sup>13,14</sup>. To examine the contribution of GPR120 to the actions of GW9508, we treated wild-type and *GPR120*-null mice with the drug for 7 days. The treatment with the drug did not alter glycaemia, triglyceridemia and insulinaemia in *GPR120*-null mice (Supplementary Table 2). GW9508-treated wild-type mice showed increased oxygen consumption both under basal conditions and following the injection with the β<sub>3</sub>-adrenergic agonist CL316,243 (Fig. 3a), consistent with the enhanced iWAT browning and signs of BAT activation shown previously. In contrast, *GPR120*-null mice showed a reduction in basal and CL316,243-triggered oxygen consumption. GW9508 treatment increased oxygen consumption in *GPR120*-null mice, but the attained levels were lower in *GPR120*-null versus wild-type mice. Moreover, the capacity of CL316,243 to induce oxygen consumption was strongly impaired in GW9508-treated *GPR120*-null mice (Fig. 3a). *GPR120*-null mice treated with GW9508 exhibited iBAT with larger lipid droplets, which is reminiscent of decreased thermogenic activity (Supplementary Fig. 4). Expression levels of thermogenesis-related transcripts was significantly altered in *GPR120*-null mice for *PGC-1α* and, especially, for *Bmp8b*, with decreased GW9508-triggered upregulations in *GPR120*-null versus wild-type mice. Total levels of UCP1 protein were unaltered in *GPR120*-null mice (Supplementary Fig. 4).

Browning, identified by the presence of numerous multilocular adipocytes and the induction of several brown-versus-white-related genes (for example, *PGC-1α*, *UCP1* and *Sirt3*) was

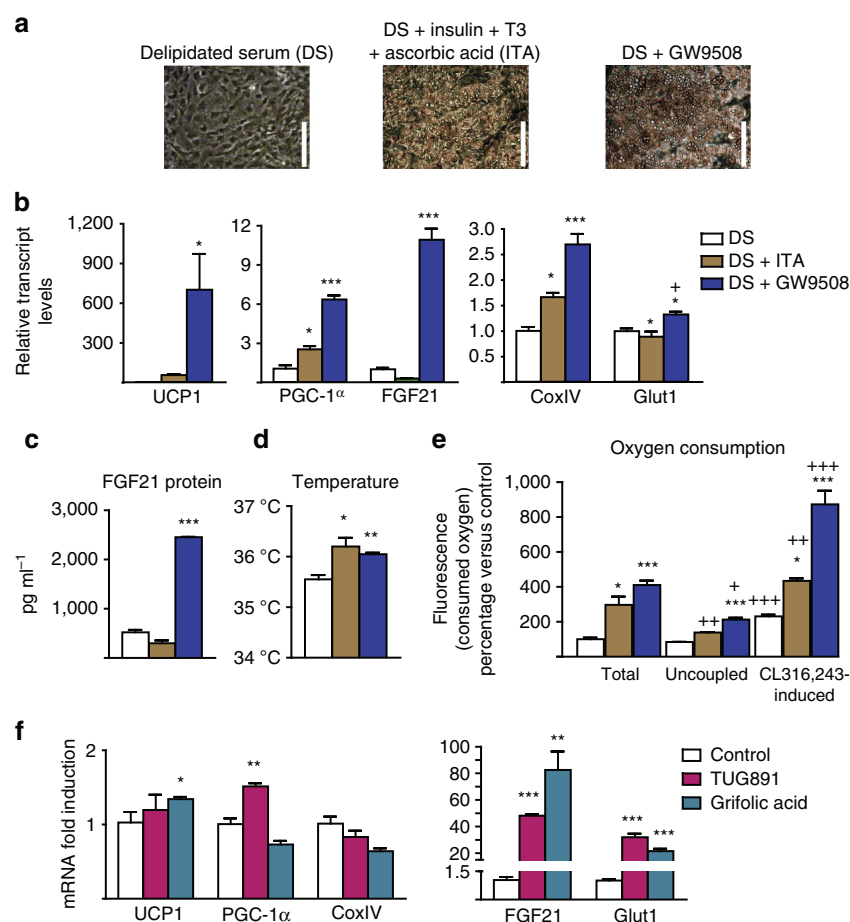
enhanced in the iWAT of GW9508-treated wild-type mice, but this induction was markedly impaired in *GPR120*-null mice (Fig. 3b,d). UCP1 protein levels in iWAT were strongly increased in wild-type mice in response to GW9508 treatment, whereas GW9508-treated *GPR120*-null showed significantly lower levels of UCP1 protein (Fig. 3c).

GPR120 invalidation had especially marked effects on circulating FGF21 levels and *FGF21* expression in the iBAT and iWAT of GW9508-treated mice. The increase of plasma FGF21 observed in GW9508-treated wild-type mice was abrogated in *GPR120*-null mice, as was the significant induction of FGF21 transcript levels elicited by GW9508 in BAT and iWAT (Fig. 3e). There was no alteration of *FGF21* gene expression in the liver, regardless of the treatment or mouse genotype.

These data indicate that GPR120 is largely required for the effects of GW9508 in BAT and iWAT 'in vivo', although the additional involvement of GPR40 cannot be ruled out in light of the dual agonist properties of GW9508.

#### Impaired thermogenesis and browning in *GPR120*-null mice.

We next tested the effects of cold exposure on *GPR120*-null mice. Most *GPR120*-null mice tolerated exposure to cold (4 °C), but ~20% developed hypothermia (a 10 °C or more drop in body temperature) within the first 24 h of cold exposure; none of the wild-type mice developed similar hypothermia. The estimated core temperature was significantly lower in *GPR120*-null mice than in wild-type mice after 1 day of cold exposure and tended to remain lower after 7 days of cold exposure (Fig. 4a). The microscopic morphology of iBAT did not show major alterations in cold-exposed *GPR120*-null mice and thermogenic gene expression pattern was essentially unaltered in *GPR120*-null mice relative to wild-type controls after 7 days of cold (Supplementary Fig. 5). However, *leptin* expression was increased in *GPR120*-null mice, which is consistent with some extent of 'whitening' in



**Figure 5 | GPR120 activation induces brown adipocyte differentiation and increases FGF21 expression and release.** For **a–e**, iBAT precursors were differentiated in the presence of standard culture medium supplemented as follows: with 10% delipidated serum (DS, white bars;  $n = 4$ ); with DS plus insulin, triiodothyronine and ascorbic acid (DS + ITA, brown bars;  $n = 5$ ); or with DS plus 100  $\mu$ M GW9508 (blue bars;  $n = 4$ ). **(a)** Representative optical microscopy images from cells at the end of the differentiation (day 9) (scale bars, 200  $\mu$ m). **(b)** Relative mRNA expression levels of *UCP1*, *PGC-1 $\alpha$* , *COXIV*, *FGF21* and *Glut1*. **(c)** FGF21 protein levels in cell culture media (4 day accumulation). **(d)** Total and uncoupled (oligomycin-resistant) respiration, and respiration after CL316,243 treatment **(f)** iBAT precursors from mice were differentiated with DS + ITA, mRNA expression levels of *UCP1*, *PGC-1 $\alpha$* , *CoxIV*, *FGF21* and *Glut1* after 24 h treatment with TUG-891 (200  $\mu$ M, pink bars) or grifolic acid (100  $\mu$ M, turquoise bars). Bars are means  $\pm$  s.e.m. ( $P$  values:  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  and  $^{***}P < 0.001$  versus DS (**b–e**) or versus controls (**f**);  $^+P < 0.05$ ,  $^{++}P < 0.01$  and  $^{+++}P < 0.001$  for uncoupled respiration or induction in respiration upon CL316,243 versus total respiration; analysis of variance with Tukey's *post hoc* test).

BAT (Supplementary Fig. 5). iWAT browning was significantly impaired in cold-exposed *GPR120*-null mice. There were far fewer clusters of multilocular adipocytes in the iWAT of *GPR120*-null mice compared with wild-type controls (Fig. 4b), whereas the relative lipid content was higher. The expression levels of the thermogenic genes *UCP1* and *Bmp8b* were reduced, and *FGF21* gene expression tended to be lower (Fig. 4c). Circulating FGF21 levels were significantly reduced in cold-exposed *GPR120*-null mice (Fig. 4d), whereas FGF21 transcript expression in the liver and skeletal muscle was unaltered (Supplementary Fig. 5).

#### GPR120 activation induces brown adipocyte thermogenesis.

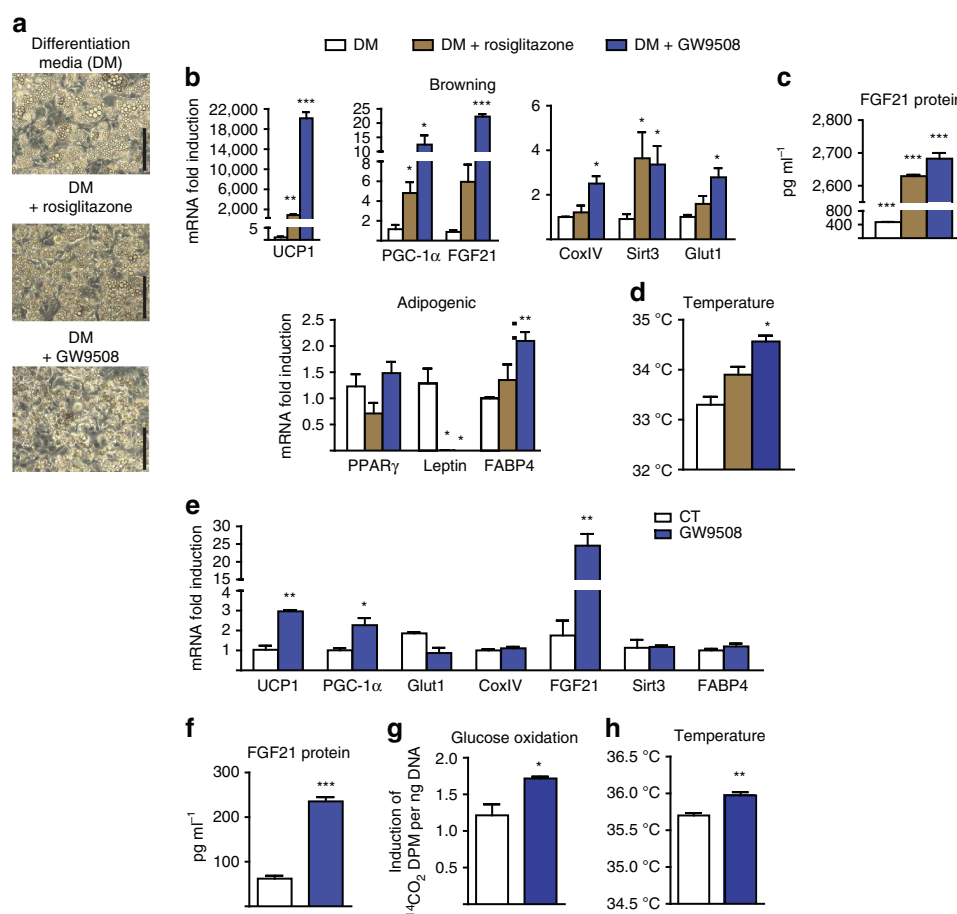
We next used cell culture systems of brown and beige adipocytes to assess whether the abilities of GPR120 activation to promote BAT activation, WAT browning and FGF21 induction were cell autonomous. GW9508 was used to determine the specific effects of GPR120 activation as brown adipocytes (similar to white adipocytes) lack detectable levels of *GPR40* transcript and thus the actions of GW9508 are only attributable to GPR120 activation<sup>13,24</sup>.

First, we determined whether GPR120 activation targets brown adipocyte differentiation. Precursor cells were obtained from

iBAT stromal vascular fractions and cultured as previously reported<sup>25</sup>. On day 4 of culture, regular medium was replaced to contain 10% delipidated serum, which does not allow differentiation (Fig. 5a)<sup>26</sup>. The addition of insulin, triiodothyronine and ascorbic acid (ITA) to the culture was sufficient to induce differentiation. Notably, the addition of GW9508 instead of ITA also yielded a robust differentiation of brown adipocytes (Fig. 5a). Analysis of brown differentiation marker genes (for example, *UCP1*, *PGC-1 $\alpha$* , *COXIV* and *Glut1*) indicated that GW9508 triggered a stronger induction compared with ITA (Fig. 5b). Among the tested genes, the highest GW9508-induced upregulation was seen for *FGF21* (Fig. 5b). These effects on *FGF21* gene expression were associated with a strong release of FGF21 to the media of GW9508-treated cultures (Fig. 5c). Highly sensitive thermography<sup>27,28</sup> showed that GW9508 treatment increased the cell cultures temperature (Fig. 5d). Moreover, oxygen consumption in brown adipocytes differentiated in the presence of GW9508 was as high as in ITA-differentiated cells (Fig. 5e). GW9508-induced differentiation also enhanced the oxygen consumption triggered by the  $\beta$ 3-adrenergic agonist CL316,243 (Fig. 5e).

We next analysed the effects of GPR120 activation on mature, differentiated, brown adipocytes (day 9 of culture). Treatment





**Figure 6 | GPR120 activation promotes beige adipocyte differentiation and increases FGF21 expression and release.** For **a-d**, iWAT precursors from mice were differentiated in the presence of the differentiation media (DM, white bars), supplemented with rosiglitazone to drive beige differentiation (DM + rosiglitazone, brown bars;  $n = 4$ ) or treated with GW9508 instead of rosiglitazone (DM + GW9508, blue bars;  $n = 5$ ; see the Methods section). **(a)** Representative optical microscopy images at the end of differentiation (day 7; scale bar, 200  $\mu\text{m}$ ). **(b)** Relative mRNA expression levels of browning-related and general adipogenic genes. **(c)** FGF21 protein levels in the cell culture medium (4 day accumulation). **(d)** Cell culture temperature. For **e-h**, iWAT precursors were differentiated and treated during 24 h with GW9508 (100  $\mu\text{M}$ , blue bars;  $n = 5$ ) or not treated ( $n = 3$ ). **(e)** mRNA expression levels of *UCP1*, *PGC-1 $\alpha$* , *Glut1*, *COXIV*, *FGF21*, *Sirt3* and *FABP4*. **(f)** FGF21 protein levels in culture media (24 h accumulation). **(g)** Glucose oxidation rate. **(h)** Cell culture temperature. Bars are means  $\pm$  s.e.m. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  versus DM (**b-d**) or versus controls (**e-h**); for **b-d**, analysis of variance with Tukey's *post hoc* test was performed; for **e-h**, two-tailed unpaired Student's *t*-test).

with GW9508 for 24 h led to a marked induction of *UCP1*, *Glut1* and *FGF21* expression, as well as a strong increase in the secretion of FGF21 protein (Supplementary Fig. 6). Moreover, GW9508 significantly induced the glucose oxidation and tended to increase the cell culture temperature (Supplementary Fig. 6).

To examine whether drugs that also activate GPR120 specifically cause similar effects, we tested TUG-891<sup>29</sup> and grifolic acid<sup>30</sup>. Indeed 0.2 mM TUG-891 and 0.1 mM grifolic acid strongly upregulated *FGF21* and *Glut1*, and had milder effects on *UCP1* and *PGC-1 $\alpha$*  (Fig. 5f).

Collectively, these results indicate that GPR120 activation has cell-autonomous effects on brown adipocytes, including a strong effect in promoting brown adipocyte differentiation and a particularly strong activation of FGF21 expression and release associated with signs of the enhanced oxygen consumption, glucose oxidation and thermogenesis.

**GPR120 activation induces beige adipocyte thermogenesis.** To analyse the cell-autonomous effects of GPR120 activation on the WAT browning process, primary cultures of precursor cells

obtained from iWAT were cultured in regular differentiation medium and exposed to rosiglitazone to promote acquisition of the beige phenotype<sup>31</sup>. Rosiglitazone treatment did not alter the morphology of differentiating cells or the lipid droplet accumulation, but did tend to decrease the lipid droplet size (Fig. 6a). Rosiglitazone did not alter the expression of general adipogenic marker genes in differentiating adipocytes; instead it downregulated leptin (a marker of the WAT versus BAT phenotype) and strongly upregulated the beige markers *UCP1* and *PGC-1 $\alpha$*  (Fig. 6b). Supplementation with GW9508 instead of rosiglitazone caused a similar, even stronger, induction of browning, as evidenced by upregulation of the beige marker genes (*UCP1*, *PGC-1 $\alpha$*  and *Sirt3*; Fig. 6b) and downregulation of leptin, while leaving most general adipogenic genes unaltered. Rosiglitazone-induced and especially GW9508-induced beige differentiation strongly upregulated the expression (Fig. 6b) and release of FGF21 (Fig. 6c). Consistent with the gene expression data, the heat production was significantly higher in GW9508-treated beige cells (Fig. 6d).

We next questioned whether the effects of the GPR120 activation also occurred in adipocytes that had differentiated to a beige phenotype. Indeed, GW9508 treatment of differentiated

beige adipocytes for 24 h triggered a moderate but significant upregulation of thermogenic marker genes (*UCP1* and *PGC-1 $\alpha$* ), and a stronger induction of *FGF21* expression (Fig. 6e) and release (Fig. 6f). GW9508 also increased the glucose oxidation rate (Fig. 6g) and cellular heat production (Fig. 6h) in beige adipocytes.

Compared with iWAT precursors, eWAT precursors yielded similar results with GW9508 inducing even stronger browning than rosiglitazone (as shown by gene expression analysis) and powerfully inducing *FGF21* expression and release in differentiated adipocytes (Supplementary Fig. 7).

### n-3 PUFAs promote brown fat activation through GPR120.

GPR120 is assumed to interact with unsaturated fatty acids—or derivatives—at the cell surface and trigger subsequent intracellular effects<sup>12</sup>. Since omega-3 PUFAs are more potent than omega-6 or omega-9 PUFAs in eliciting GPR120-mediated effects<sup>12,13</sup>, we analysed the effects of  $\alpha$ -linolenic (ALA), eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids.

Supplementation of delipidated cell culture medium with EPA or ALA markedly promoted the morphological adipogenic differentiation of brown pre-adipocytes obtained from iBAT, to a degree similar to that elicited by ITA (Fig. 7a). In contrast, DHA had barely significant effects. The thermogenic genes, especially *UCP1* and *FGF21*, were markedly induced by EPA and ALA, relative to ITA. Some induction of general adipogenic genes was also observed, especially in response to EPA (Fig. 7b). EPA and ALA also enhanced *FGF21* protein secretion relative to ITA (Fig. 7c). The cellular temperature was increased by EPA relative to cells cultured in delipidated medium, but there was no significant temperature difference relative to ITA-differentiated cells (Fig. 7d). EPA treatment increased oxygen consumption to an extent similar to that elicited by ITA, under both basal and CL316,243-treated conditions (Fig. 7e).

EPA and ALA treatment of beige adipocytes undergoing differentiation from iWAT precursors promoted their morphological differentiation (Fig. 7f), significantly upregulated the tested thermogenic-related genes (with the exception of a non-significant effect of ALA on *UCP1* and *PGC-1 $\alpha$* ), and downregulated leptin (Fig. 7g). EPA and ALA increased *FGF21* gene expression and release (Fig. 7h), but only EPA significantly increased cell temperature. Overall, in both, the brown and beige experimental settings, EPA tended to be more powerful than ALA.

As PPAR $\alpha$  is known to mediate transcriptional effects of fatty acids in brown adipocytes<sup>25</sup> and regulates *FGF21* expression in the liver<sup>32,33</sup>, we determined the effects of EPA on primary cultures of precursor cells from the iBAT of PPAR $\alpha$ -null mice. As expected, the absence of PPAR $\alpha$  did not alter the responsiveness of brown adipocytes to GW9508 (Supplementary Fig. 8a). EPA still promoted brown adipocyte differentiation and strongly induced *FGF21* in cells devoid of PPAR $\alpha$ , although the levels of *FGF21* expression attained were smaller (Supplementary Fig. 8a). We also determined whether the effects of EPA could involve PPAR $\gamma$ . Exposure of differentiating brown adipocytes to the PPAR $\gamma$  inhibitor, GW9662, did not significantly alter the effects of EPA or GW9508 on the morphological differentiation; the significant upregulation of the *FGF21* gene in response to EPA was maintained, but the levels achieved were significantly less than those observed in the absence of the PPAR $\gamma$  inhibitor (Supplementary Fig. 8b). These results indicate that although PPARs are not necessary for the ability of EPA to induce *FGF21*, they may contribute to some of the effects of EPA.

We further determined the involvement of GPR120 in mediating the effects of EPA on the brown and beige differentiation of pre-adipocytes. For this purpose, we analysed precursor cells cultures from the iBAT and iWAT of *GPR120*-null

mice and wild-type controls. Precursor cells from *GPR120*-null iBAT showed much less differentiation into brown adipocytes, as evidenced by decreased acquisition of brown adipocyte morphology (Fig. 8a), impaired expression of thermogenic marker genes (*UCP1* and *FGF21*; Fig. 8b), and signs of reduced expression of general adipogenesis marker genes. EPA treatment significantly induced *FGF21* mRNA expression (Fig. 8c) and *FGF21* protein secretion (Fig. 8d) in wild-type brown adipocytes, but not in *GPR120*-null cells that were totally insensitive to EPA. Precursor cells from *GPR120*-null iWAT showed a delayed differentiation (Fig. 8e; see microscopic morphology on day 3 of culture), but ultimately reached similar levels of thermogenic and adipogenic gene expression by day 7. The abilities of EPA to induce *FGF21* mRNA expression and *FGF21* protein release were significantly reduced in *GPR120*-null beige adipocytes (Fig. 8f).

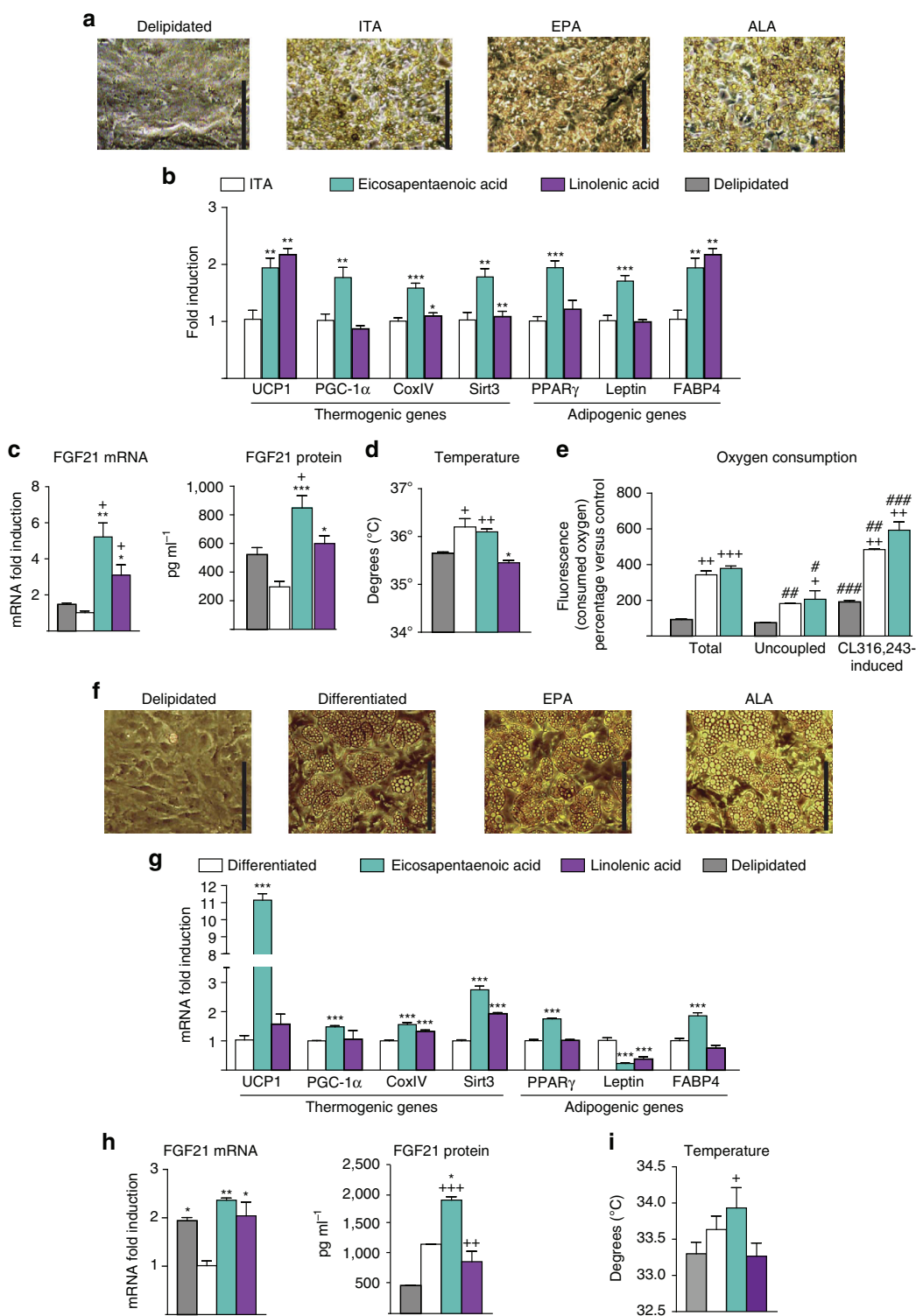
Next, we used two independent approaches to determine whether EPA affects *FGF21* expression and release by previously differentiated brown or beige adipocytes, and whether GPR120 mediated these effects. First, we treated differentiated cells with the GPR120 antagonist, AH7614 (ref. 34). As expected, AH7614 significantly inhibited the capacity of GW9508 to induce *FGF21* expression and release in brown and beige adipocytes (Fig. 8g). AH7614 also inhibited the effects of EPA on *FGF21* expression and release, indicating that these effects involve GPR120 in brown and beige adipocytes.

Second, we performed short interfering RNA (siRNA)-driven knockdown of GPR120 in brown adipocytes subjected to *in vitro* differentiation. In these cells, we obtained an 80% reduction in the mRNA expression of the GPR120 as compared with controls (Fig. 8h, left). Under these conditions of GPR120 knocking down, the abilities of GW9508 and EPA to induce *FGF21* gene expression were also strongly impaired (Fig. 8h). GPR120 knocking down also impaired the induction of *UCP1* and *PGC-1 $\alpha$*  by EPA.

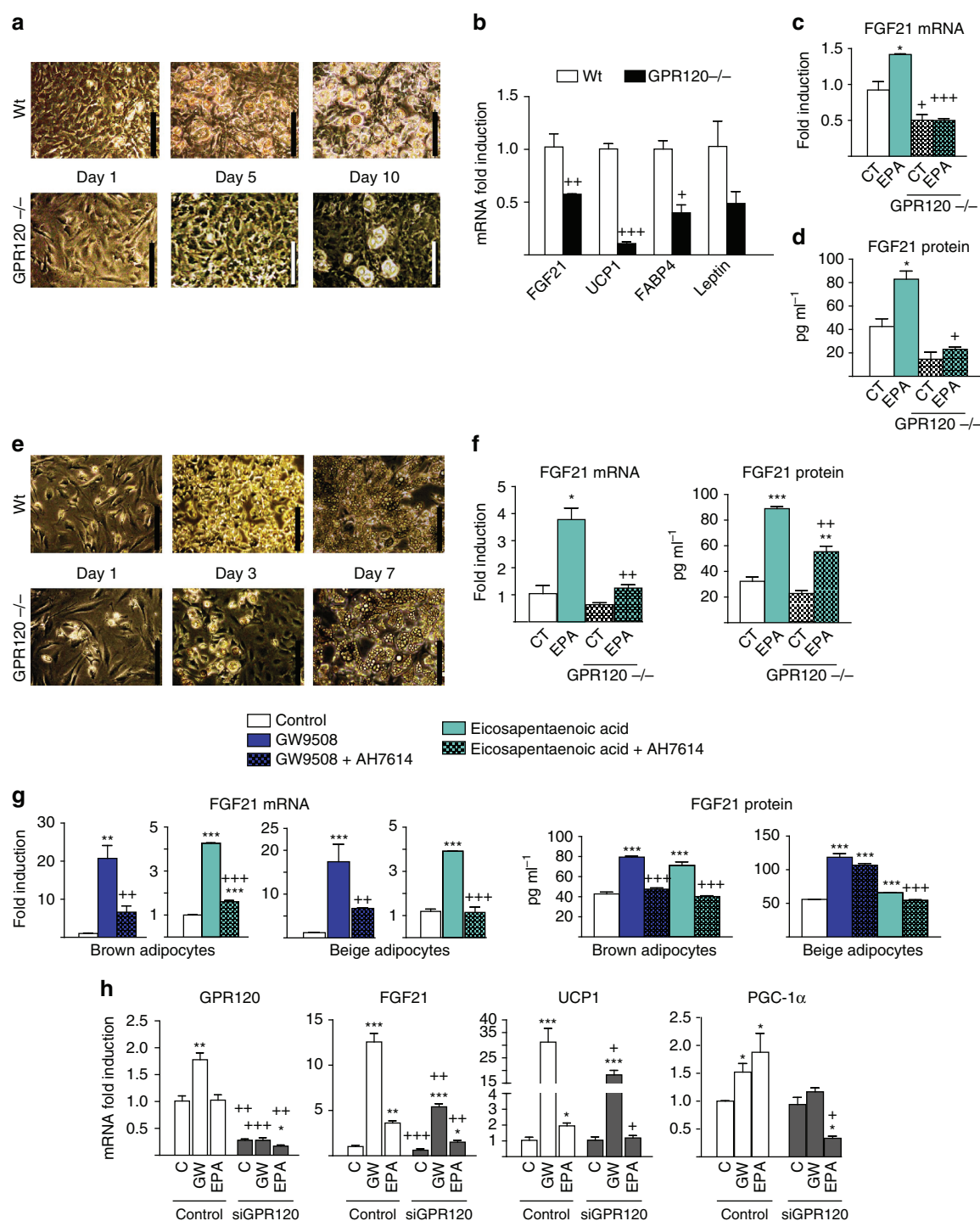
Collectively, these findings indicate that EPA induces brown and beige differentiation, and enhances *FGF21* gene expression and *FGF21* protein secretion mostly via GPR120 activation.

### GPR120-mediated induction of FGF21 involves p38 MAPkinase.

To further explore the mechanisms through which GPR120 activation induces *FGF21* gene expression, differentiated brown adipocytes were treated with GW9508 in the presence or not of intracellular kinase inhibitors. U-0128 and wortmannin significantly reduced the upregulation of *FGF21* gene expression in response to GW9508 or EPA (Supplementary Fig. 9a), confirming the previously reported involvement of ERK1/2 and PI3kinase, respectively, in the intracellular actions following GPR120 activation in other cell systems, such as white adipocytes<sup>13</sup>. In contrast, the inhibitors of PKA or AMP kinase had no effect (Supplementary Fig. 9a). Interestingly, the p38 MAPK inhibitor, SB202190, strongly impaired GW9508- or EPA-induced *FGF21* gene expression. Treatment of brown adipocytes with GW9508 or EPA induced the phosphorylations of p38 MAPK and (as expected) ERK1/2, but not of other regulatory proteins such as CREB (Supplementary Fig. 9b). As p38 MAPK mediates the regulation of *FGF21* in response to noradrenergic stimuli in BAT<sup>19</sup>, we determined the effects of GW9508 and EPA on the transcriptional regulation of the *FGF21* gene promoter. We found that these agents significantly induced the activity of the *FGF21* promoter (Supplementary Fig. 9c). Conversely, a version of the promoter devoid of the p38 MAPK-responsive site failed to respond to GW9508 or EPA. Moreover, transfection of an expression vector for MKK6 (MKK6-K82A), which acts as dominant negative for p38 MAPK-dependent activation<sup>35</sup>, blunted the effects of GW9508 and EPA on the *FGF21* gene promoter activity. These findings suggest that GPR120-induced



**Figure 7 | n-3 PUFAs upregulate thermogenic genes expression and FGF21 expression and release.** For **a–d**, iBAT precursors were cultured in media containing only delipidated serum (grey bars), or in the presence of insulin, T3 and ascorbic acid (ITA, white bars) or supplemented with eicosapentaenoic acid (EPA, turquoise bars) or linolenic acid (ALA, purple bars). **(a)** Representative optical microscopy images of cultured brown precursors after the treatment (scale bar, 200  $\mu$ m). **(b)** Relative mRNA expression of thermogenesis-related and general adipogenesis-related genes. **(c)** FGF21 mRNA in adipocytes and protein levels in culture media. **(d)** Cell culture temperature. **(e)** Total and uncoupled respiration after differentiation and after treatment with CL316,243. For **f–i**, iWAT precursors were cultured in media containing only delipidated serum (grey bars), adipogenic cocktail (see the Methods section, white bars), or supplemented with EPA (turquoise bars) or ALA (purple bars). **(f)** Representative optical microscopy images of cultured beige precursors after the treatment (scale bar, 200  $\mu$ m). **(g)** Relative mRNA expression of thermogenesis-related and general adipogenesis-related genes. **(h)** FGF21 mRNA in adipocytes, protein levels in culture media and **(i)** cell temperature at the end of the treatment. Bars are means  $\pm$  s.e.m. (\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 and \*\*\* $P$  < 0.001 versus differentiated ITA, +  $P$  < 0.05, ++  $P$  < 0.01 and +++  $P$  < 0.001 versus delipidated, # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01 and ### $P$  < 0.001 relative to total respiration; analysis of variance with Tukey's *post hoc* test).



**Figure 8 | GPR120 is required for the effects of EPA on adipocytes and FGF21 induction and release.** For **a–d**, iBAT precursors from wild-type (n = 3, white) and *GPR120*-null (n = 5, black) mice were differentiated. **(a)** Representative optical microscopy images (scale bar, 200 μm). **(b)** Relative mRNA expression levels of *FGF21*, *UCP1*, *FABP4* and *leptin*. **(c,d)** Effects of EPA on *FGF21* mRNA expression and *FGF21* secretion. For **e** and **f**, iWAT precursors from wild-type (n = 3) and *GPR120*-null (n = 5) mice were differentiated into beige adipocytes. **(e)** Representative optical microscopy images (scale bar, 200 μm). **(f)** Effects of EPA on *FGF21* mRNA expression and *FGF21* protein secretion. **(g)** Differentiated brown and beige adipocytes were treated with GW9508 (blue bars) or EPA (turquoise bars) in the presence or absence of AH7614 (a *GPR120* antagonist, patterned bars) for 24 h (n = 3). *FGF21* mRNA expression and *FGF21* protein levels in culture medium. **(h)** Differentiated brown adipocytes were subjected to siRNA-mediated knockdown of *GPR120* (see the Methods section) and treated with GW9508 or EPA. mRNA expression levels of *GPR120*, *FGF21*, *PGC-1α* and *UCP1* (n = 3). Bars are means ± s.e.m. (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 relative to controls, and +P < 0.05, ++P < 0.01 and +++P < 0.001 for comparisons between wild-type and *GPR120*-null cells (**a–f**), the effects due to AH7614 (**g**), and the effects due to siRNA-*GPR120* (**h**). For **b**, two-tailed unpaired Student's *t*-test was performed; for **c–h**, analysis of variance with Tukey's *post hoc* test).



FGF21 expression in brown adipocytes involves the activation of p38 MAPK and its downstream induction of FGF21 gene transcription.

**FGF21 is involved in the effects of GPR120 activation.** FGF21, which is a hormonal factor expressed and released by brown and beige cells<sup>19,20</sup>, has strong autocrine/endocrine effects on BAT activation and WAT browning<sup>36,37</sup>. Thus, we next explored the involvement of FGF21 in the biological response to GPR120 activation.

*FGF21*-null mice were treated with GW9508 in their diet for 1 week. The absence of FGF21 strongly impaired the capacity of GW9508 to induce BAT thermogenic activation, as evidenced by decreased induction of thermogenic genes (for example, *UCP1*, *PGC-1 $\alpha$*  and *Bmp8b*) and *Glut1*, whereas markers of general adipogenesis (for example, *FABP4*) were unaltered (Fig. 9a). *FGF21*-null mice kept under basal conditions exhibited increased lipid content, indicative of impaired activity and ‘whitening’ of BAT (Fig. 9b). GW9508 treatment of *FGF21*-null mice, in contrast with wild-type mice, even increased the signs of impaired thermogenic activity and ‘whitening’ of BAT as evidenced by increased lipid content and enhanced leptin gene expression. Moreover, GW9508 failed to increase *UCP1* protein levels in BAT from *FGF21*-null mice (Fig. 9b).

*FGF21*-null mice also showed strong impairment of iWAT browning in response to GW9508. The clusters of multilocular, beige adipocytes, seen in GW9508-treated wild-type mice were largely absent in GW9508-treated *FGF21*-null mice (Fig. 9d), and there were strong reductions in the GW9508-mediated upregulation of the thermogenic, beige phenotype-related, genes (for example, *PGC-1 $\alpha$* , *UCP1* and *Sirt3*; Fig. 9c). GW9508 treatment increased *UCP1* protein levels in iWAT from wild-type mice and the extent of induction of *UCP1* protein levels in *FGF21*-null mice was significantly lower. Although the response of eWAT to GW9508-induced browning was less marked than that in iWAT of wild-type mice, the mild upregulation observed among browning-associated genes was blunted in GW9508-treated *FGF21*-null mice (Supplementary Fig 10).

We further explored the cell-autonomous functions of FGF21 in the responsiveness to GPR120 activation. Brown adipocytes from *FGF21*-null mice differentiated normally *in vitro*, and GPR120 expression was not altered by the lack of FGF21. GW9508 was able to activate the expressions of thermogenic genes (*UCP1*, *PGC-1 $\alpha$* , *COXIV* and *Sirt3*) in cultured brown adipocytes, but the extent of these inductions were significantly less in *FGF21*-null cells than in control cells (Fig. 10a). When previously differentiated brown adipocytes from *FGF21*-null mice were treated with GW9508 for 24 h, we observed reductions in the upregulations of some thermogenic genes (Fig. 10b) and glucose oxidation (Fig. 10d). In beige adipocytes differentiated from iWAT, the lack of FGF21 reduced the GW9508-induced upregulations of beige markers (*UCP1* and *PGC-1 $\alpha$* ; Fig. 10c) and blocked the ability of GW9508 to induce glucose oxidation (Fig. 10d).

Collectively, these results indicate that at least some of the effects of GPR120 activation on the thermogenic activations of brown and beige adipocytes involve FGF21, potentially via the autocrine/endocrine actions of FGF21 secreted downstream of GPR120 activation.

## Discussion

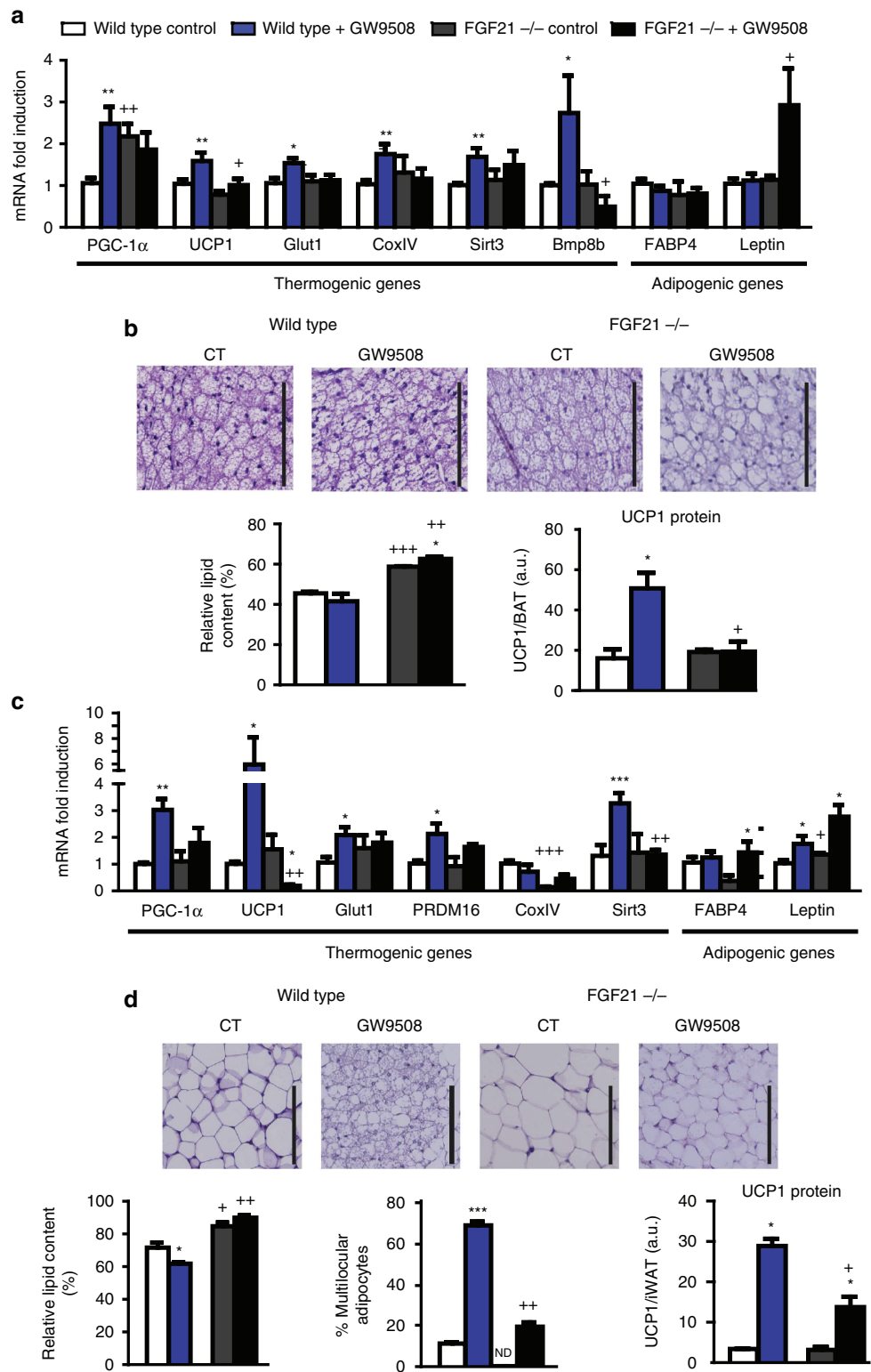
The identification of novel regulators that promote energy expenditure and the capacity of BAT activity to oxidize metabolic substrates may provide key therapeutic targets in obesity, diabetes and dyslipidemias. Attempts to promote energy expenditure by the use of sympathomimetics, which take advantage of the

classical adrenergic pathway for controlling of BAT activity, have failed due to the important side effects<sup>38</sup>.

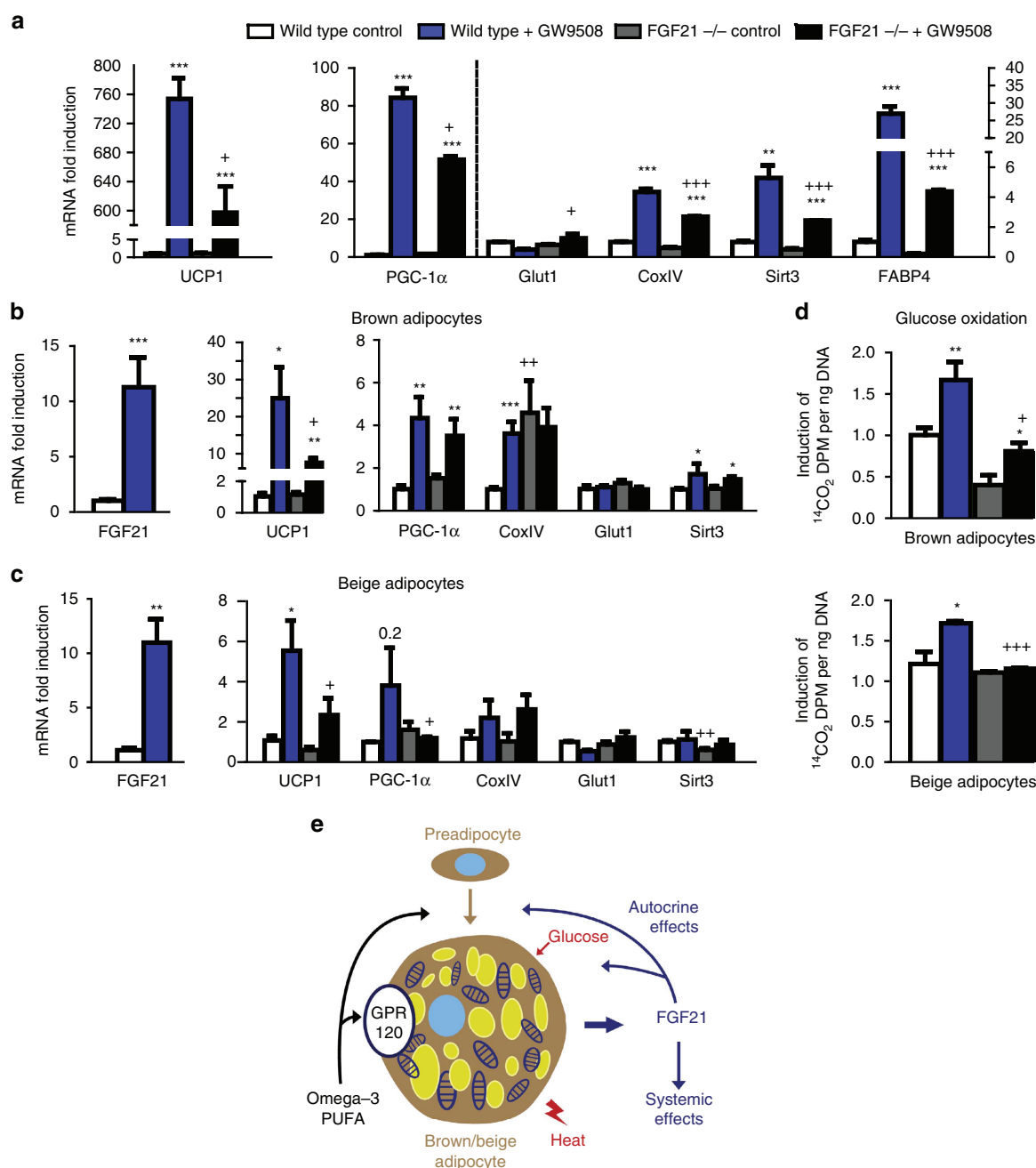
We presently identified a novel pathway regulated by the fatty acid receptor GPR120 that controls BAT activity and WAT browning. Our data indicate that GPR120 activation plays a dual role, namely: (1) it promotes the differentiation of pre-adipocytes into the brown and beige lineages; and (2) it promotes thermogenic activation in differentiated brown and beige adipocytes. Previous reports showed that GPR120 activation increases the energy expenditure and ameliorates insulin resistance<sup>13,14</sup>. Given that BAT activity and WAT browning have major impacts on energy expenditure and glucose homeostasis, our current data provide a biological basis and mechanistic explanation for these observations. This adds a new function for GPR120, in addition to its ability to decrease chronic inflammation, in association with the improved insulin resistance<sup>13,39</sup>. Modifications in the pro- and anti-inflammatory profiles of immune cells were recently reported to influence BAT activation and especially WAT browning<sup>40,41</sup>. Further research is warranted to determine the role of GPR120-mediated regulation of immune cells on BAT and browning of WAT *in vivo*; however, our current findings establish a direct, cell-autonomous effect, of GPR120 in the promotion of brown and beige cell differentiation and activation.

The effects of GPR120 activation on BAT activity and WAT browning appear to mediate the actions of omega-3 PUFAs, which are physiological activators of the GPR120 receptor, on these processes. Dietary enrichment with omega-3 PUFAs have beneficial effects on metabolic health in healthy lean individuals, whereas in experimental rodent models, omega-3 PUFA have been shown to prevent the development of obesity, and decrease hyperglycaemia and dyslipidemia<sup>42</sup>. Several reports agreed that dietary supplementation with PUFAs promote BAT recruitment and WAT browning as reflected by enhanced mitochondrial oxidative capacity and, in some reports, increased *UCP1* content<sup>43–47</sup>. Single dietary supplementation with EPA (but not DHA) has reportedly had the most significant effects<sup>43</sup>, and recent data show an especially active effect of EPA in the promotion of browning *in vitro*<sup>48</sup>. The molecular mechanisms underlying these effects remained to be clarified. Our current data indicate that omega-3 PUFAs have cell-autonomous GPR120-mediated effects directly stimulating the differentiation and activation of brown and beige adipocytes. This strongly supports the notion that GPR120 activation is involved in the actions of dietary omega-3 PUFAs on BAT activation, WAT browning and metabolic consequences, and may provide a molecular explanation for some of the beneficial effects of PUFAs.

Our study also shows that some of the effects triggered by GPR120 activation are mediated via the GPR120-induced expression and release of FGF21 in brown and beige adipose tissues. Fatty acids stimulate the expression of FGF21 in hepatic cells, which are devoid of GPR120, in a PPAR $\alpha$ -mediated manner<sup>32</sup>. However, this pathway does not mediate FGF21 gene expression in BAT<sup>19</sup>. Our present data indicate that GPR120 activation is part of a highly tissue-specific pathway that regulates FGF21 expression via the p38 MAPK-mediated activation of *FGF21* gene transcription in brown and beige cell lineages. Moreover, the effects of GPR120 activation to promote BAT activity and WAT browning are mediated at least in part by FGF21. FGF21 promotes thermogenic activation of BAT, and the browning of WAT in association with increased glucose uptake and oxidation<sup>36,37</sup>. Similar effects were seen following GPR120 activation, and these effects were reduced in FGF21-inactivated animal and cell models. Thus, we herein report that autocrine and (perhaps) endocrine actions of FGF21 are relevant to the GPR120 activation-mediated induction of BAT differentiation and WAT



**Figure 9 | FGF21 gene invalidation reduces the effects of GW9508 treatment in mice.** Wild-type and *FGF21*-null mice were fed a control diet (white and grey bars, respectively) or supplemented with GW9508 (blue and black bars, respectively) for 7 days ( $n = 5$ ). **(a)** Relative mRNA levels of thermogenesis-related and adipogenic genes in iBAT **(c)** and iWAT. Representative optical microscopy images of H&E staining (scale bar, 125  $\mu$ m), the relative lipid content and UCP1 protein levels in iBAT **(b)** and iWAT **(d)**, and the percentage of multilocular adipocytes in iWAT. Bars are means  $\pm$  s.e.m. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  relative to untreated control mice of each genotype; + $P < 0.05$ , ++ $P < 0.01$  and +++ $P < 0.001$  relative to same treatment of the wild-type group; analysis of variance with Tukey's *post hoc* test).



**Figure 10 | Impaired effects of GW9508 on FGF21-null brown and beige adipocytes.** (a) iBAT precursors from wild-type and FGF21-null mice ( $n = 5$ ) were treated with GW9508 during differentiation, relative transcript levels of *UCP1*, *PGC-1 $\alpha$* , *Glut1*, *CoxIV*, *Sirt3* and *FABP4*. (b) iBAT precursors from wild-type and FGF21-null mice ( $n = 5$ ) were differentiated and acutely treated with GW9508 (24 h), mRNA expression levels of *FGF21*, *UCP1*, *PGC-1 $\alpha$* , *CoxIV*, *Glut1* and *Sirt3*. (c) iWAT precursors from wild-type and FGF21-null mice ( $n = 5$ ) were differentiated and acutely treated with GW9508 (24 h), mRNA expression levels of *FGF21*, *UCP1*, *PGC-1 $\alpha$* , *CoxIV*, *Glut1* and *Sirt3*. (d) Glucose oxidation in iBAT and iWAT-derived adipocytes from wild-type and FGF21-null mice after 24 h treatment with GW9508. Bars are means  $\pm$  s.e.m. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  for the effects of GW9508; and + $P < 0.05$ , ++ $P < 0.01$  and +++ $P < 0.001$  for comparisons between wild-type and FGF21-null cells; and analysis of variance with Tukey's *post hoc* test). (e) Schematic representation of the effects of GPR120 activation by n-3 PUFAs on brown and beige adipocytes. FGF21 is involved in the GPR120 activation-mediated thermogenic activation of BAT and WAT via autocrine/endocrine mechanisms.

browning (Fig. 10e). Of note, the capacity of GPR120 activation to modify intracellular kinases (for example, p38 MAPK) suggests that GPR120 may have additional and direct effects on BAT activity and WAT browning.

In conclusion, we identified a novel pathway of BAT activation and browning of WAT based on a strong, cell autonomous, capacity of the lipid sensor GPR120 to trigger these processes. This pathway is expected to contribute to the systemic metabolic

benefits occurring after GPR120 activation. Our present findings reinforce the current interest in the potential of GPR120-activating drugs or dietary molecules for treating metabolic diseases.

## Methods

**RNA-seq and RNA-seq data analysis.** Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), which favours purification of RNA molecules longer than 200



nucleotides. Further sample preparation was done as described by the manufacturer (Illumina, Eindhoven, The Netherlands). Briefly, mRNA was purified from 2 µg total RNA using oligo (dT) beads, and then fragmented and randomly primed for reverse transcription followed by second-strand synthesis to create double-stranded cDNA fragments. The generated cDNA had undergone paired-end repair to convert overhangs into blunt ends. After 3'-monoadenylation and adaptor ligation, the cDNAs were purified by 2% agarose gel electrophoresis and 200-bp products were excised from the gel. Following gel digestion, the purified cDNA was amplified by PCR using primers specific for the ligated adaptors. Before sequencing, the generated libraries were submitted to a quality control assessment with an Agilent bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Wokingham, UK). The RNA integrity number values for all samples were at least 7.5. To verify the cDNA quality and quantity, 1 µl cDNA was loaded on an Agilent DNA chip (DNA-1000, Agilent Technologies). Only libraries that yielded satisfactory results from the quality control studies were sequenced on an Illumina HiSeq 2,000 sequencer (DNAnvision, Charleroi, Belgium) with an average of 45 million reads per sample. This level of coverage was previously shown to provide sufficient sequencing depth for the quantification of gene expression and detection of transcripts<sup>49</sup> and has been used in our previous studies<sup>50,51</sup>. The obtained 100 nucleotide paired-end reads were mapped to the mouse genome (version GRCm38) using the Tophat mapper. Using this approach, we were able to map 87% of the raw reads on average. Sequencing reads were mapped to the mouse genome (*Mus musculus* version GRCm38) using Tophat version 2.02 (ref. 52) under default options for paired-end read mapping. Mapped reads were used to quantify transcripts from the Ensembl version 73 gene annotation data set (<http://www.ensembl.org>) using the Flux Capacitor approach. This strategy deconvolutes reads mapping to exonic regions shared by multiple transcripts by optimizing a system of linear equations, and thus specifically assigns some reads to each alternative splice form (<http://flux.sammeth.net>)<sup>53</sup>. All genes and transcripts were assigned relative coverage rates as measured in RPKM units ('reads per kilobase per million mapped reads')<sup>54</sup>. Lists of differentially expressed genes and transcripts were generated from the Flux Capacitor output using scripts in Perl or R. The 88,346 transcripts annotated in Ensembl 73 corresponded to 33,358 genes. Mice kept under the thermoneutral temperature were found to express a median of 18,494 genes. Of them, 15,971 genes were found in all tested individuals.

To define the genes that were upregulated or downregulated by cold, the fold change was calculated as the proportion between the sum of the RPKM for all gene transcripts under the cold condition and the same sum in control condition. Significance was tested using a Fisher's exact test (the number of reads mapped to a given gene and number of reads mapped to all other genes in the cold condition versus the control condition) and corrected by the Benjamini-Hochberg method (taking for each gene the four samples as independent tests). A difference in gene expression was considered significant if the corrected *P* value was <0.05. As additional criteria, a gene was considered to be 'modified by cold' only if its expression changed significantly in the same direction—that is, 'up' or 'down'—in at least three out of four samples per group and no significant change in the opposite direction was observed, as in previous studies<sup>50,51</sup>.

**Animals and treatments in vivo.** For RNA-seq analysis, eight adult (5 months old at the moment of the experiment) male C57BL6 mice were obtained from Harlan Laboratories and were maintained at thermoneutral temperature (29 °C). After 2 weeks, four mice randomly were placed at an environment temperature of 4 °C for 24 h. Cold-exposed mice and thermoneutral controls were killed by decapitation, iBAT was dissected and frozen for further analysis. *Fgf21*<sup>-/-</sup> mice (B6N.129S5-Fgf21<sup>tm1Lex/Mmcd</sup>) were obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC), an NCRR-NIH-funded strain repository, having been donated to the MMRRC by Genentech, Inc. *Pparα*-null mice (B6.129S4-*Ppara*<sup>tm1Gonz/J</sup>) were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). *GPR120* -/- mice (Ffar4<sup>tm1(KOMP)Vlcg</sup>) were purchased from MMRRC. Adult (5 months old) male wild-type littermates were used as controls for all experiments with *Fgf21*-null mice, *Pparα*-null mice and *GPR120*-null mice. When indicated, mice were injected intraperitoneal with 1 mg kg<sup>-1</sup> CL316,243.

GW9508 (Cayman Chemical) was administered to adult (5 months old) male C57BL6 mice through the diet at a dose calculated to yield an intake of 50 µg g<sup>-1</sup> body weight per day GW9508 intake<sup>55</sup> for 1 week. The diet was prepared as previously described<sup>56</sup> by soaking diet pellets in an acetone solution of the drug; the control diet in was also soaked in acetone and dried. For cold-exposure treatments, *GPR120*-null, *FGF21*-null and the corresponding wild-type littermates were exposed to 4 °C ambient temperature during the indicated timing. Mice were subjected to non-invasive measurements (see below), and then they were killed, and blood and tissues were collected. Tissue samples were frozen for further RNA and/or protein analysis, or placed in 10% buffered formalin overnight and processed for hematoxylin and eosin (H&E) staining and optical microscopy using standard procedures. The relative lipid content and percentage of multilocular adipocytes were measured from optical microscopy images using ImageJ and CellProfiler software, with at least five independent preparations quantified for each experimental group. Data of the relative lipid content and the area occupied by multilocular adipocytes were expressed as percentages relative to total image area.

The volume of consumed oxygen, the volume of produced carbon dioxide and the respiratory quotient were determined (Harvard Apparatus). Rectal temperature

was determined using an electronic thermistor equipped with a rectal probe. Body temperature was non-invasively estimated by measuring the eye-surface temperature using a high-sensitivity infrared thermography camera (FLIR T335), as previously reported<sup>57,58</sup>.

All experiments were performed in accordance with European Community Council directive 86/609/EEC and experiments, as well as the number of animals to be used were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Barcelona based on the expected effects size.

**Serum biochemistry.** Glucose and triglyceride levels were measured using Accutrend Technology (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). FGF21 levels were quantified with ELISA (RD291108200R, Biovendor). Insulin, adipokines and cytokines were quantified using a Multiplex system (MADKMAG-HK, Millipore).

**Brown and beige adipocyte cell cultures.** Stromal vascular cells were obtained from iBAT and eWAT excised from 3-week-old C57BL6 mice (males and females), primary cultures were generated and the cells were induced to differentiate into brown and beige adipocytes, respectively, following the previously reported procedures<sup>25,26</sup>. Brown adipocyte differentiation was achieved by exposing confluent precursor cells from iBAT in DMEM/F12 medium containing 10% foetal bovine serum (FBS) and supplemented with 20 nM insulin, 2 nM T3 and 0.1 mM ascorbic acid (ITA).

For beige cell differentiation, confluent precursor cells from iWAT and eWAT were maintained in DMEM/F12 containing 10% newborn calf serum (NCS). For differentiation, 850 nM insulin, 3 µM T3, 35 nM dexamethasone and 10 µM rosiglitazone were added. When indicated, pre-adipocytes were cultured in the presence of delipidated serum (Charcoal Stripped Serum-GIBCO) instead of FBS/NCS.

Cells were treated either across the differentiation process or were treated acutely (24 h), when already differentiated. Treatments included TUG-891 (200 µM), grifolic acid (100 µM), GW9508 (100 µM), ALA (100 µM), EPA (100 µM), NE (0.5 µM), dibutyl-*c*-AMP (1 mM), SB202190 (10 µM), H89 (20 µM), GW7647 (1 µM), GW9662 (30 µM), AH-7614 (100 µM), U-0128 (10 µM), compound C (10 µM), wortmannin (2 µM) and CL316,243 (1 µM). All reagents were obtained from Sigma with the exception of TUG-891, AH-7614, GW9662 (from Tocris), GW9508 (from Cayman Chemical), compound C (Calbiochem) and U-0128 (Enzo). When indicated, cells were subjected to dynamic measurements (see below) and/or further collected for RNA extraction.

**Dynamic measurements of adipocytes in culture.** Glucose oxidation rates were determined in cultured adipocytes. Cells were incubated for 60 min in the appropriate cell culture medium containing [<sup>14</sup>C]-glucose after which trapped [<sup>14</sup>C]-CO<sub>2</sub> was measured. Cellular heat production was measured by infrared thermography in accordance with an initial report<sup>59</sup> further developed for application to brown adipocytes<sup>27,28</sup>. Basically, brown or beige adipocytes were grown in a 12-well plate and placed on a 37 °C heat block in a polystyrene box coated with black paper to optimize insulation. Images were acquired by an infrared camera (FLIR systems T335, Wilsonville, OR, USA), which detects a 7.5–13 µm spectral response with a thermal sensitivity of 0.1 °C, and analysed using the FLIR Quick Report software (Wilsonville, OR, USA). Supplementary Figure 11 shows an example of thermographic recording of brown adipocytes in culture. Oxygen consumption of cells was recorded using the Oxygen Biosensor System (BD) in the absence or presence (uncoupled respiration) of 10 µg ml<sup>-1</sup> oligomycin, and also after exposure of cells to CL316,243 for 24 h, as previously described<sup>30</sup>.

**siRNA-mediated interference.** Reverse transfection of differentiated adipocytes was performed using the Lipofectamine RNAiMAX (InvitroGene) and OptiMEM (Life Technologies) reagents, random duplexes or two independent siRNA duplexes designed to silence *GPR120* (67928017 and 67928014, final concentration 10 µM), all from Integrated DNA Technologies-TriFECTA. One day after transfection, the cells were exposed to various treatments and then collected for analysis of extracted RNA and conditioned media.

**Transient transfection of promoter constructs.** Reverse transfection of differentiated brown adipocytes with the plasmid -1497-FGF21-Luc, containing the 5' region of the mouse FGF21 gene linked to the luciferase reporter gene, and the deleted form 69-FGF21-Luc<sup>19</sup> was performed using Lipofectamine. Where indicated, an expression plasmid for a dominant-negative form of MKK6 (MKK6-K82A, Addgene plasmid 13,519) was co-transfected (0.06 µg per well). The pRL-CMV expression plasmid for the sea pansy (*Renilla reniformis*) luciferase was used as an internal transfection control (Promega, Madison, WI, USA). Cells were incubated for 48 h after transfection, and where indicated, they were treated with 100 µM GW9508 or 100 µM EPA for 24 h before collecting. Firefly luciferase activity elicited by FGF21 promoter constructs was normalized for variation in transfection efficiency using *Renilla* luciferase as an internal standard, all measured in a Turner Designs luminometer (TD 20/20) using the Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega).

**Quantitative PCR with reverse transcription.** Reverse transcription was performed, using random hexamers primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

and 0.5 µg RNA in a total reaction volume of 20 µl. For PCR, Taqman Gene Expression Assay probes were used (Supplementary Table 3), with reaction mixtures containing 1 µl cDNA, 10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 250 nM probes and 900 nM of primers from the Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix. The 18S rRNA was measured as the housekeeping reference gene. The mRNA level of the gene of interest in each sample was normalized to that of the reference control using the comparative ( $2^{-\Delta\text{CT}}$ ) method, according to the manufacturer's instructions. A transcript was considered to be non-detectable when  $\text{CT} \geq 40$ .

**Immunoblots and multiplex protein assays.** Western blot analysis of tissue and cell culture extracts was performed following standard procedures, using primary anti-UCP1 (1:1,000 ab10983, Abcam, Cambridge, UK) and anti-GPR120 (1:150sc-99105, Santa Cruz, USA). Specificity of GPR120 detection was checked using BAT extracts from male C57BL6 *GPR120*-null mice (Supplementary Fig. 12). Loading controls were established using  $\alpha$ -tubulin immunoblots (T9026, Sigma-Aldrich) or Ponceau staining of membranes. Immunoreactive proteins were detected using an ECL (enhanced chemiluminescence) system (GE Healthcare). Signal intensities were quantified by scanning densitometry (Phoretics 1D Software). Uncropped scans of western blots and corresponding Ponceau-stained membranes, including scale markers are shown in Supplementary Fig. 13. Quantitative measurements of changes in phosphorylated ERK1/2, CREB and p38 MAPK were performed using multiplex-based technology (48–680MAG and 48–681MAG kits, Millipore, Billerica, MA, USA) by determining the ratio of the corresponding phosphoproteins relative to total specific proteins.

**Statistics.** Two-tailed unpaired Student's *t*-test or one-way analysis of variance were used to test for the statistical significance of differences between two experimental conditions. Welch's correction was applied when unequal variances were detected by *F*-test, using the GraphPad statistical software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Statistical significance was set with an  $\alpha$ -value of  $P < 0.05$ , and underlying assumptions for validity of all tests were assessed. Data are shown as means  $\pm$  s.e.m.

**Data availability.** The raw data generated during the RNA-seq procedure is deposited in Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE77534. The complete list of cold-modulated genes in BAT after RNA-seq data analysis is available at <http://lmedex.ulb.ac.be/data.php>.

## References

- Lowell, B. B. *et al.* Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* **366**, 740–742 (1993).
- Feldmann, H. M., Golozoubova, V., Cannon, B. & Nedergaard, J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* **9**, 203–209 (2009).
- Betz, M. J. & Enerbäck, S. Human brown adipose tissue: what we have learned so far. *Diabetes* **64**, 2352–2412 (2015).
- Giralt, M. & Villarroya, F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* **154**, 2992–3000 (2013).
- Shabalina, I. G. *et al.* UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* **5**, 1196–1399 (2013).
- Kazak, L. *et al.* A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell* **163**, 643–698 (2015).
- Plaisier, C. L. *et al.* Zbtb16 has a role in brown adipocyte bioenergetics. *Nutr. Diabetes* **2**, e46 (2012).
- Rosell, M. *et al.* Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **306**, E945–E964 (2014).
- Sultan, M. *et al.* A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* **321**, 956–1016 (2008).
- Tang, F. *et al.* RNA-Seq analysis to capture the transcriptome landscape of a single cell. *Nat. Protoc.* **5**, 516–551 (2010).
- van Bakel, H., Nislow, C., Blencowe, B. J. & Hughes, T. R. Most 'dark matter' transcripts are associated with known genes. *PLoS Biol.* **8**, e1000371 (2010).
- Ulven, T. & Christiansen, E. Dietary fatty acids and their potential for controlling metabolic diseases through activation of FFA4/GPR120. *Annu. Rev. Nutr.* **35**, 239–263 (2015).
- Oh, D. Y. *et al.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **142**, 687–785 (2010).
- Ichimura, A. *et al.* Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature* **483**, 350–354 (2012).
- Hao, Q. *et al.* Transcriptome profiling of brown adipose tissue during cold exposure reveals extensive regulation of glucose metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **308**, E380–E392 (2015).
- Iwasaki, K. *et al.* Free fatty acid receptor GPR120 is highly expressed in enteroendocrine K cells of the upper small intestine and has a critical role in GIP secretion after fat ingestion. *Endocrinology* **156**, 837–883 (2015).
- Gotoh, C. *et al.* The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 591–597 (2007).
- Cao, W., Medvedev, A. V., Daniel, K. W. & Collins, S. beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 27077–27082 (2001).
- Hondares, E. *et al.* Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **286**, 12983–12990 (2011).
- Wu, J. *et al.* Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366–442 (2012).
- Hirasawa, A. *et al.* Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* **11**, 90–94 (2005).
- Suh, H. N., Huong, H. T., Song, C. H., Lee, J. H. & Han, H. J. Linoleic acid stimulates gluconeogenesis via Ca<sup>2+</sup> + /PLC, cPLA2, and PPAR pathways through GPR40 in primary cultured chicken hepatocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, 1518–1545 (2008).
- Gavaldà-Navarro, A. *et al.* Fibroblast growth factor 21 in breast milk controls neonatal intestine function. *Sci. Rep.* **5**, 13717 (2015).
- Wu, Q. *et al.* Identification of G-protein-coupled receptor 120 as a tumor-promoting receptor that induces angiogenesis and migration in human colorectal carcinoma. *Oncogene* **32**, 5541–5550 (2013).
- Barbera, M. J. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J. Biol. Chem.* **276**, 1486–1579 (2001).
- Schlüter, A., Barberá, M. J., Iglesias, R., Giralt, M. & Villarroya, F. Phytanic acid, a novel activator of uncoupling protein-1 gene transcription and brown adipocyte differentiation. *Biochem. J.* **362**, 61–70 (2002).
- Lee, P., Werner, C. D., Kebebew, E. & Celi, F. S. Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *Int. J. Obes. (Lond)* **38**, 170–176 (2014).
- Lee, P. *et al.* Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell Metab.* **19**, 302–309 (2014).
- Hudson, B. D. *et al.* The pharmacology of TUG-891, a potent and selective agonist of the free fatty acid receptor 4 (FFA4/GPR120), demonstrates both potential opportunity and possible challenges to therapeutic agonism. *Mol. Pharmacol.* **84**, 710–735 (2013).
- Hara, T. *et al.* Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **380**, 247–302 (2009).
- Aune, U. L., Ruiz, L. & Kajimura, S. Isolation and differentiation of stromal vascular cells to beige/brite cells. *J. Vis. Exp.* **73**, 50191 (2013).
- Badman, M. K. *et al.* Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* **5**, 426–437 (2007).
- Inagaki, T. *et al.* Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab.* **5**, 415–425 (2007).
- Sparks, S. M. *et al.* Identification of diarylsulfonamides as agonists of the free fatty acid receptor 4 (FFA4/GPR120). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 3100–3103 (2014).
- Raingaud, J. *et al.* MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1247–1255 (1996).
- Hondares, E. *et al.* Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab.* **11**, 206–212 (2010).
- Fisher, F. M. *et al.* FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* **26**, 271–281 (2012).
- Villarroya, F. & Vidal-Puig, A. Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab.* **17**, 638–643 (2013).
- Oh, D. L. *et al.* A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice. *Nat. Med.* **20**, 942–949 (2014).
- Qiu, Y. *et al.* Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* **157**, 1292–1308 (2014).
- Rao, R. R. *et al.* Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell* **157**, 1279–1291 (2014).
- Flachs, P., Rossmel, M. & Kopecky, J. The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol. Res.* **63**, S93–S118 (2014).
- Oudart, H. *et al.* Brown fat thermogenesis in rats fed high-fat diets enriched with omega polyunsaturated fatty acids. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **21**, 955–1017 (1997).
- Sadurskis, A., Dicker, A., Cannon, B. & Nedergaard, J. Polyunsaturated fatty acids recruit brown adipose tissue: increased UCP content and NST capacity. *Am. J. Physiol.* **269**, e351–e411 (1995).

45. Takahashi, Y. & Ide, T. Dietary omega fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. *Br. J. Nutr.* **84**, 175–259 (2000).
46. Flachs, P. *et al.* Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white at of dietary obese mice in response to calorie restriction and omega fatty acids. *Diabetologia* **54**, 2626–2664 (2011).
47. Villarroya, J. *et al.* Fibroblast growth factor-21 and the beneficial effects of long-chain omega polyunsaturated fatty acids. *Lipids* **49**, 1081–1090 (2014).
48. Fleckenstein-Elsen, M. *et al.* Eicosapentaenoic acid and arachidonic acid differentially regulate adipogenesis, acquisition of a brite phenotype and mitochondrial function in primary human adipocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* **60**, 2065–2075 (2016).
49. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 57–63 (2009).
50. Eizirik, D. L. *et al.* The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. *PLoS Genet.* **8**, e1002552 (2012).
51. Cnop, M. *et al.* RNA sequencing identifies dysregulation of the human pancreatic islet transcriptome by the saturated fatty acid palmitate. *Diabetes* **63**, 1978–1993 (2014).
52. Trapnell, C. *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **28**, 511–516 (2010).
53. Montgomery, S. B. *et al.* Transcriptome genetics using second generation sequencing in a Caucasian population. *Nature* **464**, 773–780 (2010).
54. Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**, 621–628 (2008).
55. Ou, H. Y. *et al.* Multiple mechanisms of GW-9508, a selective G protein-coupled receptor 40 agonist, in the regulation of glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **304**, E668–E676 (2013).
56. Cabrero, A. *et al.* Bezafibrate reduces mRNA levels of adipocyte markers and increases fatty acid oxidation in primary culture of adipocytes. *Diabetes* **50**, 1883–1890 (2001).
57. Johnson, S., Rao, S., Hussey, S. B., Morley, P. S. & Traub-Dargatz, J. L. Thermographic eye temperature as an index to body temperature in ponies. *J. Equine. Vet. Sci.* **31**, 63–66 (2011).
58. Purslow, C. & Wolffsohn, J. S. The relation between physical properties of the anterior eye and ocular surface temperature. *Optom. Vis. Sci.* **84**, 197–201 (2007).
59. Paulik, M. A. *et al.* Development of infrared imaging to measure thermogenesis in cell culture: thermogenic effects of uncoupling protein-2, troglitazone, and beta-adrenoceptor agonists. *Pharm. Res.* **15**, 944–949 (1998).

## Acknowledgements

We thank A. Peró and M. Morales for technical support. Scientific and technical advice by Dr C. Wolfrum and M. Christian is acknowledged. This work has been supported by Grants SAF2014-55725 and PI14/00063 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), Spain, and co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF), and by the European Community's Seventh Framework Program (FP7 BetaBat for F.V. and D.L.E.) and the Horizon 2020 Program (T2Dsystems (GA667191)) to D.L.E. T.Q.-L. was supported by a CONACyT (National Council for Science and Technology in Mexico) Ph. D. scholarship. R.M. and M.C. were supported by PhD scholarships from MINECO, Spain.

## Authors contributions

The experiments were conceived and designed by T.Q.-L., D.L.E. and F.V.; RNA-seq data were obtained and analysed by J.-V.T., R.C. and D.L.E.; experiments with mice were performed by T.Q.-L., R.M., A.P. and R.I.; cell culture experiments were performed by T.Q.-L., M.G., M.P. and A.G.-N.; analysis of microscopy images was performed by M.C. and M.G.; overall data were analysed by T.Q.-L., M.G., D.L.E. and F.V. The paper was written by F.V. and revised/approved by all contributors.

## Additional information

**Supplementary Information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**How to cite this article:** Quesada-López, T. *et al.* The lipid sensor GPR120 promotes brown fat activation and FGF21 release from adipocytes. *Nat. Commun.* **7**, 13479 doi: 10.1038/ncomms13479 (2016).

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

